

Arzneiformen zur Verabreichung von Proteinen am und im Auge

Stefan Rothschenk

Arzneiformen zur Verabreichung von Proteinen am und im Auge

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Fakultät Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Stefan Rothschenk
aus Bernkastel-Kues
im Juni 2009

Diese Doktorarbeit entstand in der Zeit von Juli 2004 bis Dezember 2008 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg.

Die Arbeit wurde von Prof. Dr. Achim Göpferich angeleitet.

Promotionsgesuch eingereicht am: 29.05.2009

Mündliche Prüfung am: 15.07.2009

Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. S. Elz	(Vorsitzender)
	Prof. Dr. A. Göpferich	(Erstgutachter)
	PD Dr. C. Framme	(Zweitgutachter)
	Prof. Dr. J. Heilmann	(Drittprüfer)

„Wie viele Male schaut der Wille durch's Fenster,
ehe die Tat durch's Tor geht.“

Erasmus von Rotterdam

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1	Einleitung und Ziele der Arbeit	9
Kapitel 2	Materialien und Methoden	33
Kapitel 3	Herstellung von Augeninserten auf Alginatbasis	59
Kapitel 4	Rheologische Untersuchung der Quervernetzung von Alginaten	71
Kapitel 5	In vitro Untersuchungen zur Auflösung von Alginat-Augeninserten	85
Kapitel 6	Beladung von Alginat-Augeninserten mit EGF	97
Kapitel 7	Entwicklung eines Drug Delivery Systems für die intraokuläre Anwendung	125
Kapitel 8	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	139
Literaturverzeichnis		145
Anhang	Liste der verwendeten Abkürzungen	159
	Lebenslauf	163
	Publikationen	165
	Danksagungen	167

Kapitel 1

Einleitung und Ziele der Arbeit

Erkrankungen der Augen können in Deutschland aufgrund der guten medizinischen Versorgung im Allgemeinen gut behandelt werden. Trotzdem gibt es Erkrankungen, deren Behandlung sich auf die Linderung von Symptomen beschränkt, wie zum Beispiel das „Trockene Auge“. Um die Beschwerden der Patienten zu lindern, wird die Augenoberfläche mehrmals am Tag mit künstlicher Tränenflüssigkeit in Form von Augentropfen benetzt. Ein neuer, kausaler Therapieansatz wäre die Verwendung von Wachstumsfaktoren wie dem in der Tränenflüssigkeit vorkommenden epidermalen Wachstumsfaktor (engl. „Epidermal Growth Factor“, EGF) [143]. Damit dieser aber seine volle Wirkung entfalten kann, muss er über einen langen Zeitraum im Auge präsent sein. Daher wird für seine Anwendung eine besondere Darreichungsform, das Augeninsert, benötigt.

Eine weitere nur schwer zu behandelnde Krankheit ist die Altersbedingte Makuladegeneration, die als Hauptursache für Erblindungen in Industriestaaten gilt [68]. Für dieses Krankheitsbild ist in den letzten Jahren mit der antiangiogenen Therapie eine effektive Behandlungsmethode gefunden worden. Um die dazu notwendigen Antikörper an der Netzhaut zur Wirkung zu bringen, müssen diese allerdings wiederholt direkt in das Auge injiziert werden; dies birgt einige schwerwiegende Risiken (s. Abschnitt 3.2). Die regelmäßigen Injektionen könnten durch ein intraokulares Drug Delivery System, welches die Antikörper langsam im Auge freisetzt, umgangen werden. Ein solches System wäre also eine deutliche Verbesserung der aktuellen Therapie.

1. Anatomie der Augen

Die Augen bilden ein paariges Sinnesorgan, mit dem der Mensch seine Umgebung räumlich erfasst. Der Aufbau eines Augapfels (Bulbus) ist schematisch in Abb. 1 wiedergegeben [44]. Jedes Auge hat eine annähernd kugelige Form und sitzt gut geschützt in der knöchernen Augenhöhle (Orbita). Die Lederhaut (Sklera), die das Auge nach außen hin begrenzt, ist zusammen mit dem Augeninnendruck formgebend für das Auge. Im vorderen Bereich der Lederhaut ist die durchsichtige Hornhaut (Cornea) eingelassen, durch die das Licht ins Auge eintritt. Nach innen schließt sich die Aderhaut (Chorioidea) an, welche die angrenzenden Schichten ernährt [134]. Zusammen mit dem Ziliarkörper und der Regenbogenhaut bildet sie die mittlere Augenhaut (Uvea). An die Aderhaut schließt sich als innere Augenhaut die Netzhaut (Retina) an. Sie besteht aus einem lichtunempfindlichen Teil an der Rückseite von Iris und Ziliarkörper und dem lichtempfindlichen Teil, der die Photorezeptoren enthält und die Innenfläche des Bulbus auskleidet. Der Aufbau der Netzhaut wird in

Abschnitt 1.2 genauer erläutert. Gegenüber der Linse befindet sich der gelbe Fleck (Macula lutea) mit der Fovea centralis, der Stelle des schärfsten Sehens. Hier werden die einfallenden Lichtstrahlen von der Linse gebündelt, um an der Stelle mit der höchsten Photorezeptordichte ein scharfes Bild der Umgebung entstehen zu lassen. Der größte Teil des Augapfels wird vom Glaskörper ausgefüllt, einem hyalinen Gebilde, das aus einem feinen Fibrillennetz und dem zu 98% aus Wasser bestehenden Humor vitreus besteht [117]. Dieser bildet zusammen mit der Retina und der Aderhaut den hinteren Augenabschnitt. Der vordere Augenabschnitt enthält die Linse, den Ziliarkörper mit Iris, die Hornhaut und die beiden Augenkammern mit dem Kammerwasser [44].

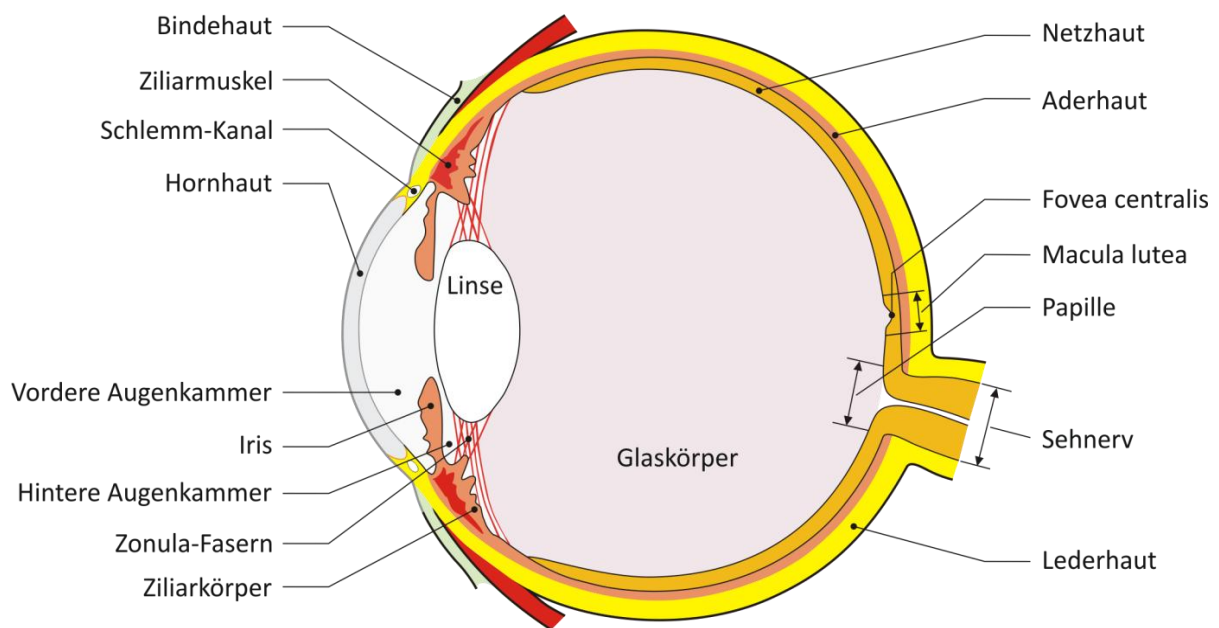


Abb. 1: Schematischer Horizontalschnitt durch den rechten Augapfel [44].

Des Weiteren gehören zum Auge als sogenannte „Anhangsgebilde“ die Bindehaut, die Augenlider und die Tränenorgane. Die Anhangsgebilde schützen das Auge und sollen seine Funktion erhalten. Die Bindehaut (Conjunctiva) bedeckt den vorderen Teil der Lederhaut bis zum Rand der Hornhaut und geht in den Umschlagsfalten oben und unten auf die Innenwand der Augenlider über. Sie enthält unter anderem Becherzellen, deren Sekret für die Benetzung der Augenoberfläche eine wichtige Rolle spielt und außerdem eine reibungsfreie Bewegung der Augen ermöglicht [44]. Die Augenlider schützen den Augapfel durch den reflektorisch gesteuerten Lidschluss vor schädigenden Einflüssen von außen. Tagsüber wird außerdem mit jedem Lidschlag der präkorneale Tränenfilm erneuert, was für die optischen Eigenschaften

der Hornhaut äußerst wichtig ist. Im Schlaf dagegen werden die Lider dauerhaft geschlossen und verhindern so ein Austrocknen der Augenoberfläche.

1.1 Tränenfilm und Tränenorgane

Zu den Tränenorganen zählen die Tränendrüsen und ein Kanalsystem zum Abtransport der Tränenflüssigkeit (s. Abb. 2). Die Tränendrüse liegt oben am äußeren Rand der Augenhöhle und produziert zusammen mit den akzessorischen Tränendrüsen, welche in der oberen und unteren Umschlagsfalte der Bindehaut liegen, die wässrige Phase des Tränenfilms. Pro Minute werden etwa 5-7 μl Tränenflüssigkeit gebildet [44], die durch die sogenannten Drüsenausführungsgänge auf die Augenoberfläche kommen und dann durch den Lidschlag über das Auge verteilt werden. Durch die spezielle Bewegung der Augenlider (diese beginnt zuerst am äußeren Lidwinkel und setzt sich dann in Richtung Nase fort) wird die Flüssigkeit zum inneren Lidwinkel transportiert [83; 137]. Dort wird sie von den Tränenpünktchen aufgenommen, über die Tränenkanälchen in den Tränensack gepumpt und gelangt schließlich über den Tränennasengang in die Nase. Auf diesem Weg fließen circa 75% der Tränen aus den Augen ab, die restlichen 25% verdunsten direkt von der Augenoberfläche [83].

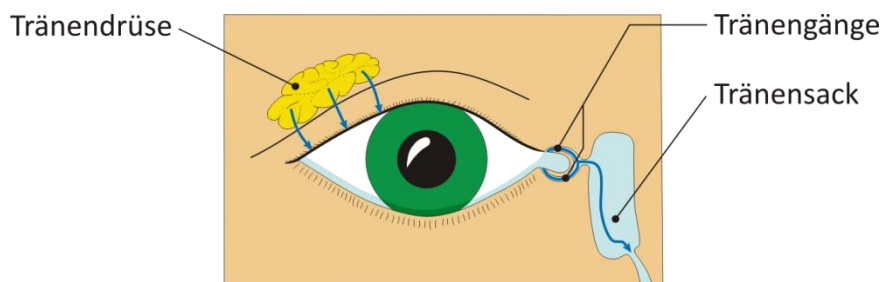


Abb. 2: Tränenorgane am menschlichen Auge (nach [125]).

Der Tränenfilm auf der Augenoberfläche ist aus drei Schichten aufgebaut: Zur Luft hin wird er von der Lipidschicht abgeschlossen, die in den Meibom-Drüsen der Augenlider gebildet wird. Mit jedem Lidschlag wird sie erneuert [13] und dient als Verdunstungsschutz für die darunter liegende wässrige Schicht [72]. Die wässrige Schicht wird von den Tränendrüsen gebildet und macht ca. 98% des Tränenfilms aus. Sie befeuchtet die Oberfläche der Augen, dient aber auch der mechanischen Reinigung von Horn- und Bindehaut. In dieser Schicht sind Elektrolyte und verschiedene Proteine gelöst, um die Oberflächenspannung der Flüssigkeit herabzusetzen, damit sich der Tränenfilm leichter ausbilden kann [72]. Die Tränendrüse produziert aber auch Proteine und Peptide, die eine spezifische Wirkung auf die Augenoberfläche haben, wie zum Beispiel den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, engl.

Epidermal Growth Factor) [143]. Zusammen mit weiteren Wachstumsfaktoren und Vitamin A ist dieser für die Instandhaltung der Augenoberfläche zuständig und steuert die Proliferation und Differenzierung der Epithelzellen, erhöht die Muzinproduktion (siehe unten) und mildert möglicherweise entzündliche Vorgänge ab [109]. Durch ihren Gehalt an Lysozym besitzt die wässrige Tränenflüssigkeit außerdem bakterizide Eigenschaften [44]. Die innerste Schicht des Tränenfilms wird von Muzinen gebildet, die in gelöster Form von den Becherzellen in der Bindehaut sezerniert werden. Muzine sind Glykoproteine, die sowohl gelöst als auch in der Zellmembran verankert vorkommen. Als transmembranäre Muzine tragen sie zur Stabilität des Tränenfilms bei, indem sie die Oberfläche der Netzhaut hydrophiler machen [61; 72], damit sie von der wässrigen Schicht benetzt werden kann. Die gelösten Muzine sind für das nicht-Newton'sche Fließverhalten der Tränen verantwortlich und verhindern somit Beschädigungen durch Scherkräfte, die während schneller Augen- und Lidbewegungen entstehen könnten [61].

1.2 Die Netzhaut

Als Netzhaut wird die lichtempfindliche innere Augenhaut bezeichnet, die aus zwei Blättern, dem Pigmentepithel und dem Stratum nervosum besteht [134]. Das retinale Pigmentepithel als äußerste Schicht der Netzhaut dient der Ernährung der Photorezeptoren und nimmt auch deren abgestoßene Membranscheibchen (s. u.) zur Weiterverarbeitung auf [44; 141]. Das Stratum nervosum ist der eigentliche lichtempfindliche Teil der Netzhaut, in dem histologisch weitere Schichten zu erkennen sind (s. Abb. 3). Diese Schichten werden von drei hintereinander geschalteten Neuronen gebildet, welche die Lichtreize aus dem Auge ins Gehirn weiterleiten. Die jeweils ersten Neuronen einer solchen Kette sind die Photorezeptoren, die über die Bipolarzellen (zweites Neuron) mit den Ganglienzellen (drittes Neuron) verbunden sind. Die Axone der Ganglienzellen laufen zur Papille und treten hier aus dem Auge aus, um den Sehnerv bilden. Die Papille (auch „blinder Fleck“ genannt) trägt keine Photorezeptoren, da hier zum einen die Axone das Auge verlassen, zum anderen die Netzhautgefäße ins Auge eintreten [44; 134]. Die Epithelzellen dieser Gefäße sind, wie auch die der Aderhautgefäße, über „tight junctions“ miteinander verbunden, um den unkontrollierten Übergang von Blutbestandteilen in das Auge zu verhindern. Dieser Effekt wird noch durch die Zellen des retinalen Pigmentepithels verstärkt, die ebenfalls über „tight junctions“ verbunden sind. Zusammen bilden sie die sogenannte „Blut-Retina-Schranke“, die den unkontrollierten Übergang von Blutplasmabestandteilen ins Auge verhindert und die für die Homöostase der Netzhaut eine wichtige Rolle spielt [28] (s. a. Abschnitt 2.3).

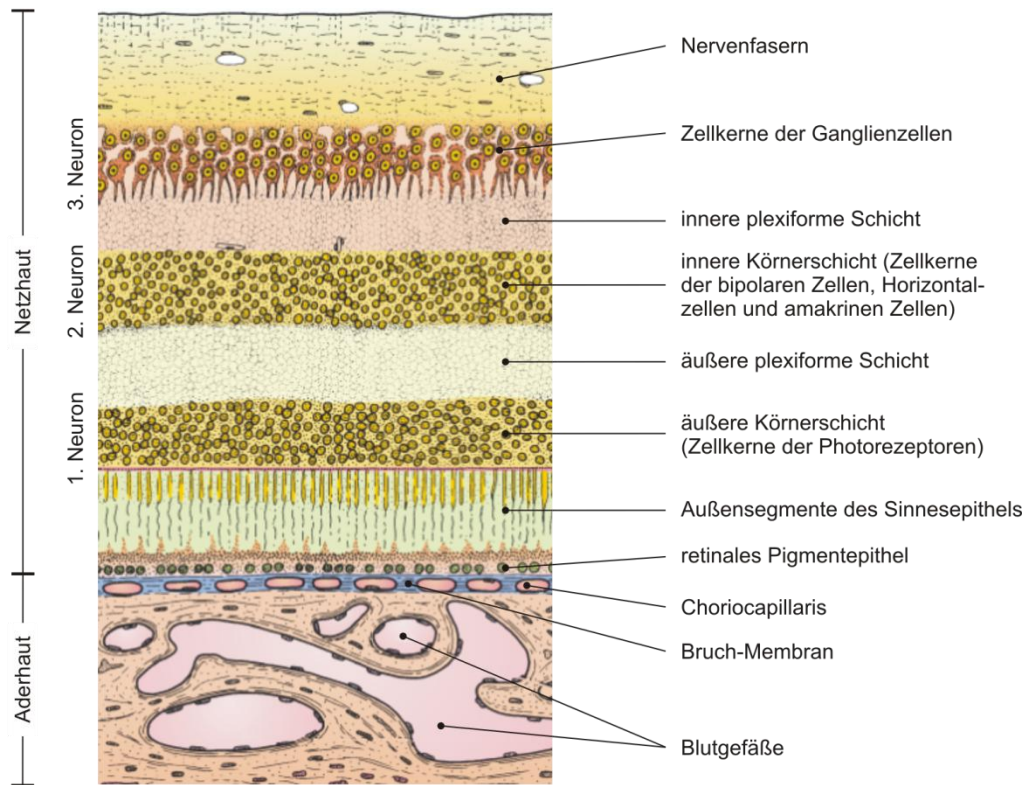


Abb. 3: Schematischer Schnitt durch die Ader- und Netzhaut (nach [44]).

In der Netzhaut finden sich zwei funktionell unterschiedliche Arten von Photorezeptoren, die Stäbchen und die Zapfen. Beiden gemeinsam ist ihr zellulärer Aufbau mit einem inneren und einem äußeren Segment, das stab- beziehungsweise zapfenförmig ist. Das äußere Segment enthält, eingelagert in scheibchenförmige Protein-Lipid-Lamellen, die Sehfärbstoffe. Diese bewirken die elektrische Erregung der Rezeptorzelle aufgrund eines Lichtreizes [125]. Die Scheibchen mit den Sehfärbstoffen werden ständig von der Basis her erneuert und an der Spitze nach außen abgestoßen. Das innere Segment dient dem Zellstoffwechsel und enthält folglich Mitochondrien und Ribosomen [134], wohingegen sich die Zellkerne der Photorezeptoren weiter im Augeninneren in der mikroskopisch erkennbaren äußeren Körnerschicht befinden (s. Abb. 3). Die sich daran weiter nach innen anschließenden Bipolar- und Ganglienzellen bündeln die Signale von mehreren Photorezeptoren und leiten sie gemeinsam an das Sehzentrum weiter. Sie dienen also der ersten Signalverarbeitung, die noch in der Netzhaut stattfindet [134]. Die Zellkerne der Bipolarzellen sind im Mikroskop als innere Körnerschicht zu erkennen, die der Ganglienzellen bilden die letzte gut sichtbare Schicht der Retina. In den zwischen den Körnerschichten gelegenen plexiformen Schichten liegen die Zellfortsätze, die die jeweiligen Neuronen miteinander verbinden.

Gegenüber der Linse, im Zentrum der Netzhaut, befindet sich der gelbe Fleck (Macula lutea). Als Photorezeptoren kommen hier vorwiegend Zapfen und nur wenige Stäbchen vor. Die Mitte der Macula bildet eine ausschließlich mit Zapfen besetzte Vertiefung, die Fovea centralis („Sehgrube“). Hier ist die Stelle des schärfsten Sehens, auf die sämtliche einfallenden Lichtstrahlen von der Linse gebündelt werden. Eine weitere Besonderheit ist die „Verschaltung“ der Neuronen an dieser Stelle des Auges, da nur hier jede Bipolarzelle mit genau einem Zapfen auf der einen Seite und einer Ganglienzelle auf der anderen Seite verbunden ist, wodurch ein besonders hohes Auflösungsvermögen der zentralen Netzhaut gewährleistet ist [134]. Die Fovea ist gegenüber der restlichen Netzhaut vertieft, da hier die Axone der nachgeschalteten Zellen seitwärts laufen, damit das Licht ungestört auf die Photorezeptoren fallen kann [44].

2. Erkrankungen der Augen

2.1 „Trockenes Auge“

Der Name „Trockenes Auge“ suggeriert eine einfache Verminderung der Tränenproduktion. Allerdings ist die Erkrankung deutlich komplexer und betrifft vor allem den Tränenfilm und die interpalpebrale Augenoberfläche. Der synonym verwendete Begriff „Keratoconjunctivitis sicca“ (KCS) [78] unterstreicht die entzündliche Komponente der Krankheit, als deren Symptome Brennen, Jucken, Fremdkörpergefühl und gerötete Augen [116], sowie erhebliche Irritationen und Photophobie [72] beschrieben werden. Außerdem kann es in schweren Fällen zur Beeinträchtigung des Sehvermögens kommen.

Auf dem „International Dry Eye WorkShop 2007“ wurde die Definition des Trockenen Auges überarbeitet. Danach ist das Trockene Auge eine „multifaktorielle Erkrankung der Tränen und der Augenoberfläche, die zu Beschwerdesymptomen, Sehstörungen und Träneninstabilität mit möglicher Beschädigung der Augenoberfläche führt. Sie wird von erhöhter Osmolarität des Tränenfilms und Entzündung der Augenoberfläche begleitet“ [82]. Das Trockene Auge wird hier als Störung der Tränenfunktionseinheit angesehen, die aus den Tränendrüsen, der Augenoberfläche (mit Hornhaut, Bindehaut und Meibom-Drüsen), den Augenlidern und den diese Einheiten verbindenden Nerven besteht. Normalerweise wird durch diese Tränenfunktionseinheit die Stabilität des Tränenfilms gewährleistet, der für die Erhaltung der Transparenz der Hornhaut und damit auch für die Qualität des auf die Netzhaut projizierten Bildes verantwortlich ist. Wird durch eine Störung der Tränenfunktionseinheit die Stabilität des Tränenfilms beeinträchtigt, kann es zur Manifestation des Trockenen Auges kommen (siehe Abschnitt 2.2). Eine solche Störung kann beispielsweise die chronische Reizung der Augenoberfläche durch Umweltfaktoren wie niedrige Luftfeuchtigkeit oder das Tragen von Kontaktlinsen sein [130]. Außerdem ist bei Patienten, die am Trockenen Auge leiden, die Zusammensetzung der wässrigen Tränenschicht verändert. Diese enthält dann eine höhere Konzentration an Elektrolyten, was wahrscheinlich auf eine vermehrte Verdunstung zurückzuführen sein dürfte [61]. Allerdings produziert die Tränendrüse von KCS-Patienten auch weniger EGF und es konnte eine inverse Korrelation zwischen der EGF-Konzentration in der Tränenflüssigkeit und der Anfärbung der Augenoberfläche mit Bengalrosa nachgewiesen werden [105]. Bengalrosa färbt geschädigte Epithelzellen an [65], eine verringerte EGF-Konzentration in der Tränenflüssigkeit kann also zur Schädigung der Augenoberfläche führen.

Grundsätzlich werden zwei Kategorien der KCS unterschieden: die durch einen Mangel an Tränenflüssigkeit bedingte Form (engl. „aqueous tear-deficient dry eye“, ADDE) und die durch vermehrte Wasserverdunstung bedingte Form (engl. „evaporative dry eye“, EDE) [82]. Beim ADDE wird das Tränenvolumen durch eine verminderte Tränendrüsensekretion verringert, wobei die häufigste primäre Ursache dafür fortgeschrittenes Alter ist. Aufgrund der allgemeinen Bevölkerungsentwicklung wird die Erkrankung daher in Zukunft noch an Bedeutung zunehmen [128]. Die verminderte Tränensekretion kann mit Hilfe des Schirmer-Tests nachgewiesen werden [15]. Dazu wird ein Streifen Filterpapier fünf Minuten lang in den Bindehautsack eingehängt; währenddessen bleiben die Augen geschlossen, um die Verdunstung der Tränenflüssigkeit zu verhindern. Nach diesen fünf Minuten wird die angefeuchtete Strecke gemessen, wobei ein Wert von ≤ 5 mm eine verminderte Sekretion anzeigt [72]. Als Sonderform des ADDE ist das sogenannte „Sjögren-Syndrom“ zu nennen, eine Autoimmunerkrankung, die neben den Tränendrüsen auch die Speicheldrüsen zerstört [79].

Beim EDE wird der Tränenfilm durch vermehrtes Verdunsten von Wasser aus der wässrigen Schicht dünner, so dass es schneller zum Aufreißen des Tränenfilms kommen kann. Häufigste Ursache für die gesteigerte Verdunstung ist eine Dysfunktion der Meibom-Drüsen, die eine nur mangelhafte Ausbildung der Lipidschicht des Tränenfilms nach sich zieht [14]. Zur Bewertung der Instabilität des Tränenfilms wird die Tränenfilmaufriszeit (engl. „break-up time“, BUT) gemessen [15], die mit der Dicke der Lipidschicht korrelieren soll [122]. Dabei wird eine bestimmte Menge Fluoreszein in den präkornealen Tränenfilm appliziert und anschließend mit einer Spaltlampe die Augenoberfläche beobachtet. Die BUT variiert normalerweise sehr stark, mit Werten zwischen 15 und 34 Sekunden [77], ein Wert von < 10 s wird als unphysiologisch angesehen [81]. Als weitere Ursachen des EDE können Störungen beim Lidschluss und eine geringere Frequenz des Lidschlags, wie sie zum Beispiel während konzentrierter Arbeit vorkommt, genannt werden [138].

2.2 Pathogenese der KCS

Bei der Pathogenese des Trockenen Auges spielen zwei Bedingungen eine zentrale Rolle: die Tränenhyperosmolarität und die Instabilität des Tränenfilms [82]. Abb. 4 zeigt schematisch, wie diese Kernmechanismen durch die verschiedenen Auslöser (siehe oben) aktiviert werden können und wie sich die Krankheit dann weiter entwickelt.

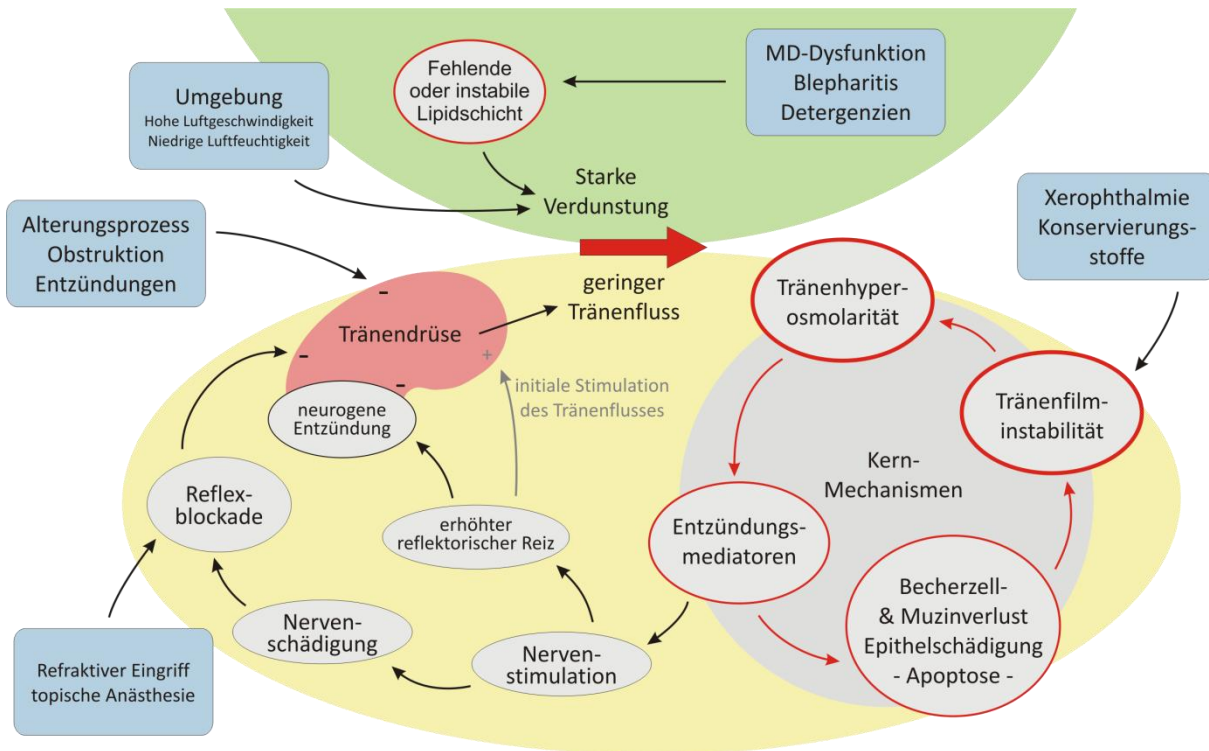


Abb. 4: Pathogenese der Keratoconjunctivitis sicca (nach [82]):

In den blauen Kästen werden die Ursachen der Erkrankung genannt, die grauen Kreise zeigen die während der Entstehung der Krankheit ablaufenden Vorgänge. Die rot umrandeten Vorgänge spielen dabei eine Schlüsselrolle und verstärken sich in Form eines Teufelskreises gegenseitig.

Die Tränenhyperosmolarität resultiert aus einer starken Verdunstung der Tränenflüssigkeit von der Augenoberfläche oder aus deren verringerten Bildung in der Tränenrinne. Durch die Hyperosmolarität werden Epithelzellen zur Bildung von Entzündungsmediatoren angeregt, die einerseits einen Teufelskreis antreiben, andererseits aber auch die Nerven stimulieren. Die andauernde erhöhte reflektorische Reizung der Tränenrinne kann eine neurogene Entzündung auslösen, wodurch Drüsengewebe zerstört und der Tränenfluss weiter verringert wird.

Eine Tränenfilminstabilität, wie sie zum Beispiel aufgrund des Vitamin-A-Mangels bei einer Xerophthalmie vorkommt [117], bewirkt ein verfrühtes Aufreißen des Tränenfilms innerhalb des normalen Blinzelintervalls. Dadurch kommt es lokal zu einer Austrocknung der exponierten Oberfläche und somit auch zu einer Hyperosmolarität des Epithels. Ist die Instabilität des Tränenfilms auf eine mangelhafte Lipidschicht zurückzuführen, führt die vermehrte Verdunstung zu einer hyperosmolaren Tränenflüssigkeit, welche die zentrale Rolle bei der Pathogenese spielt [82]. Die Verdunstung kann auch (ohne Instabilität des Tränenfilms) durch das Umfeld erhöht sein, z.B. bei starkem Wind. Eine Hyperosmolarität entsteht ferner bei verringertem Tränenfluss aus der Tränenrinne, da in diesem Fall (wegen der unveränderten exponierten Oberfläche) die normale Verdunstung von Wasser nicht schnell

genug ausgeglichen werden kann. Gründe für eine verringerte Tränenproduktion sind in erster Linie das fortgeschrittene Alter, des Weiteren wird eine entzündliche Infiltration der Tränendrüse beschrieben oder es kann durch eine vernarbende Konjunktivitis zu einem Verschluss der ausführenden Drüsengänge kommen. Eine Hyposekretion kann auch nerval bedingt sein [82].

Die Hyperosmolarität der wässrigen Tränenflüssigkeit bewirkt entzündliche Veränderungen auf der Augenoberfläche, die mit einer Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel IL-1, TNF- α und MMP9 einhergehen [5; 61; 82]. Durch diese entzündlichen, aber auch direkt durch die osmotischen und mechanischen Belastungen der Augenoberfläche kommt es hier zu einer Stimulation der sensorischen Nerven. Diese sind Teil des Reflexbogens, der die Tränenproduktion und den Lidschlag steuert. Daher wird eine kompensatorische Reaktion mit gesteigertem Tränenfluss und vermehrtem Blinzeln postuliert, die zu Beginn der Krankheit auftreten soll [82]. Die ausgeschütteten Entzündungsmediatoren führen aber auf der Augenoberfläche zur Apoptose von Epithel- und Becherzellen, was zu einem weiteren Muzinverlust [12] und infolgedessen zu einem instabileren Tränenfilm führt. Durch die andauernde nervale Stimulation kann es innerhalb der Tränendrüse zu einer neurogenen Entzündungsreaktion kommen, wodurch Drüsengewebe zerstört wird [111]. Die Tränendrüse wird dabei von Lymphozyten infiltriert, welche hier die Entzündungsmediatoren IL-1, IL-6 und TNF- α ausschütten [131], die durch die Tränenflüssigkeit zur Augenoberfläche transportiert werden und hier einen Circulus vitiosus antreiben. Dieser führt über den Becherzellverlust und die Tränenfilminstabilität zu einer weiter verstärkten Hyperosmolarität der Tränenflüssigkeit, wodurch die Krankheit weiter fortschreitet. Dabei spielt die der Krankheit zugrunde liegende Ursache keine Rolle mehr.

2.3 Altersbedingte Maculadegeneration

Die Altersbedingte Maculadegeneration (AMD) ist eine im hohen Lebensalter auftretende Erkrankung der zentralen Netzhaut, die zur Degeneration der Macula lutea führt. Dadurch wird vor allem in späten Stadien der Krankheit die Sehschärfe drastisch vermindert. Jegliche Fixierung von Objekten mit den Augen (z. B. beim Lesen) ist dann aufgrund des zentralen Sehfeldverlusts nicht mehr möglich, allerdings können sich die Betroffenen noch selbständig orientieren, da die periphere Netzhaut erhalten bleibt [44].

Die Diagnose einer AMD erfolgt durch die ophthalmoskopische Begutachtung des Augenhintergrundes, wobei als charakteristische Zeichen sogenannte Drusen auf der Netzhaut erkennbar sind. Drusen sind hyaline Einlagerungen in der Basalmembran des retinalen

Pigmentepithels, die bei älteren Menschen häufig zu beobachten sind [121]. Nach ihrem Aussehen werden harte und weiche Drusen unterschieden, wobei nur große, weiche Drusen ($> 63\mu\text{m}$) als Anzeichen einer AMD gelten. Sie enthalten unter anderem Pigmentkörner und Reste von Photorezeptoren, was auf ihre Herkunft aus dem Pigmentepithel deutet [1]. Im frühen Stadium der Erkrankung können außerdem noch Hyper- und Hypopigmentierungen der Netzhaut zu sehen sein. Je größer die Drusen sind, bzw. je größer die hypo- oder hyperpigmentierte Fläche ist, desto höher ist das Risiko für ein spätes Stadium der AMD [66].

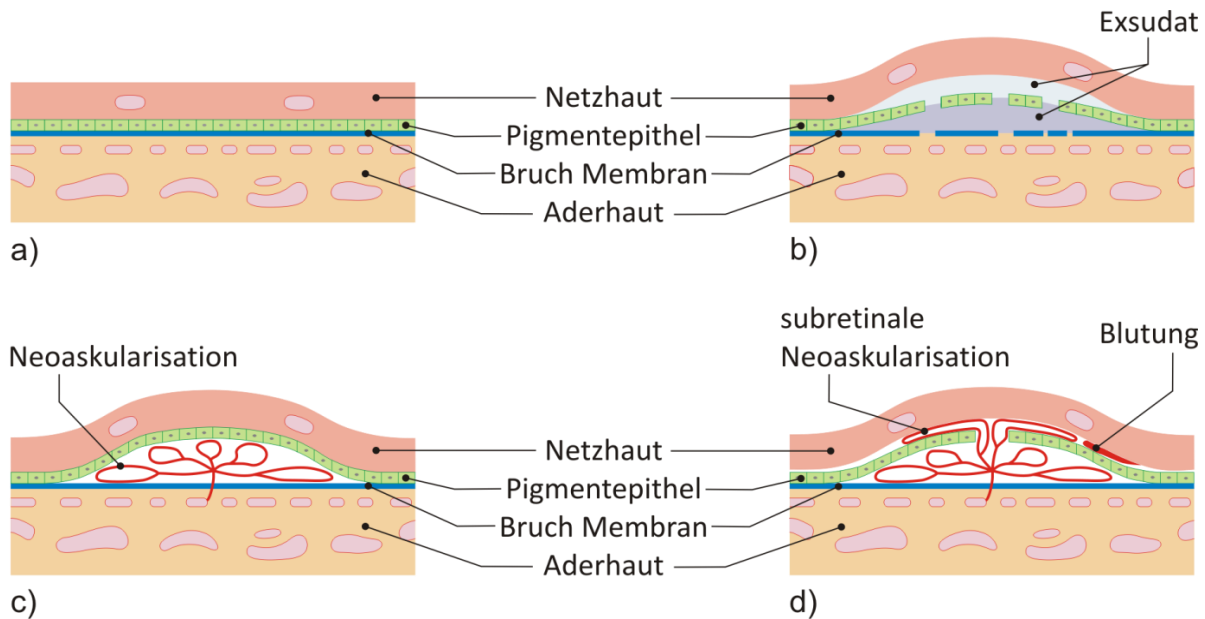


Abb. 5: Schemazeichnungen der Vorgänge bei einer feuchten AMD:

- a) physiologischer Zustand
- b) Maculaödem
- c) CNV
- d) CNV mit Durchbruch des RPEs.

Es werden zwei späte Stadien der AMD unterschieden, die trockene und die feuchte Form, die bei einem Patienten gleichzeitig vorkommen können, entweder getrennt voneinander in verschiedenen Augen oder auch gemeinsam im gleichen Auge. Außerdem kann im weiteren Verlauf eine trockene AMD zu einer feuchten AMD werden und umgekehrt [26]. Patienten, die an der trockenen Form leiden, bemerken als erstes Symptom einen grauen Schatten in der Bildmitte oder ein lückenhaftes Bild. Dieses entsteht durch die hier im Vordergrund stehende Atrophie der zentralen Netzhaut [44]. Bei der feuchten Form dagegen kommt es zur Metamorphopsie, einem verzerrt wahrgenommenen Bild, das durch ein Maculaödem entsteht. Dieses ist eine Ansammlung von Exsudat unterhalb der Netzhaut, das sich in Folge einer Störung der Blut-Retina-Schranke unterhalb der zentralen Netzhaut bildet und diese nach vorne wölbt (s. Abb. 5b) [28]. Dadurch kommt es zu einer fehlerhaften Ausrichtung der

Photorezeptoren, was die verzerrte Wahrnehmung erklärt. Im weiteren Verlauf bilden sich chorioidale Neovaskularisationen (CNVs), das heißt es wachsen Gefäßschlingen aus dem Kapillarnetz der Aderhaut unter das retinale Pigmentepithel (RPE) und unter die sensorische Netzhaut (s. Abb. 5c/d). Aus diesen neuen Gefäßen kann es leicht zu Blutungen kommen, die dann die Netzhaut zerstören [44].

Auch wenn zunächst nur ein Auge betroffen ist, wird sich innerhalb eines Jahres auch im zweiten Auge eine AMD entwickeln. Ohne eine Behandlung kommt es einige Monate nach Erkrankung des zweiten Auges zur Erblindung im gesetzlichen Sinne, das heißt die Sehschärfe fällt unter $\frac{1}{50}$ (0,02) [26; 44]. In der westlichen Welt ist die Altersbedingte Maculadegeneration die häufigste Erblindungsursache, mit einer Prävalenz von nur 0,05% bei unter 50-Jährigen, aber 11,8% bei Menschen über 80 Jahren [35].

2.4 Pathogenese der AMD

Die genaue Pathogenese der Altersbedingten Maculadegeneration ist noch nicht bekannt, bis jetzt gilt nur ein hohes Lebensalter als einziger gesicherter Risikofaktor. Auch warum die Degeneration nur den gelben Fleck betrifft, während die periphere Netzhaut weiter intakt bleibt, ist derzeit noch unbekannt. Man nimmt an, dass es zu einer Schädigung durch Lichteinfluss kommt [63]. Im Alter auftretende Veränderungen finden sich nur an der äußeren Netzhaut (dazu zählen die Photorezeptoren, das retinale Pigmentepithel und die Bruch-Membran) und an der sich an diese anschließenden Kapillarschicht der Aderhaut (Choriokapillaris) [26].

Das retinale Pigmentepithel spielt bei der Pathogenese eine wichtige Rolle. Zu seinen Aufgaben gehören die Regeneration des Sehfärbstoffes Rhodopsin und die Phagozytose der von den äußeren Segmenten der Photorezeptoren abgestoßenen lipidreichen Membranscheibchen [147]. Diese werden von den Zellen in Lysosomen verstoffwechselt, wobei nicht-abbaubares Lipofuscin entsteht und in der RPE-Zelle angereichert wird. Lipofuscin ist ein sogenanntes „Alterspigment“, das aus modifizierten Lipiden und Proteinen besteht und sich in Epithelzellen anreichert [117]. Seine Akkumulation im RPE beginnt bereits im 16. Lebensmonat und geht bis ans Lebensende weiter. Dadurch verringert sich das Zytoplasmavolumen stetig, was die Funktion der RPE-Zelle (vor allem die Phagozytose) im Alter einschränkt [148]. Außerdem wirkt Lipofuscin als photosensibilisierendes Chromophor, das bei Bestrahlung mit Licht reaktive Sauerstoffspezies produziert [95]. Diese können in Analogie zur Atherosklerose über eine Lipidperoxidation zu entzündlichen Vorgängen führen. Dabei werden dendritische Zellen aus der Chorioidea wahrscheinlich von den geschädigten RPE-

Zellen sowie von oxidierten Lipiden in der Bruch-Membran (s. u.) aktiviert [47]. Da Photorezeptoren in ihren äußeren Segmenten viele mehrfach-ungesättigte Fettsäuren enthalten, ist die Macula aufgrund der hohen Zapfendichte und des andauernden Lichteinfalles besonders betroffen.

Eine weitere Aufgabe von RPE-Zellen ist die Bildung und Erhaltung von Extrazellulär-matrix (ECM), der sogenannten Bruch-Membran [26]. Diese verbindet das RPE mit der Choriokapillaris und ist somit für die Versorgung der Photorezeptoren mit Sauerstoff und Nährstoffen von Bedeutung. Normalerweise diffundieren diese über die Bruch-Membran zum Pigmentepithel und von dort zu den Photorezeptoren. Während des Alterungsprozesses verdickt sich die Membran und Lipide werden darin eingelagert, so dass die Diffusion der Nährstoffe behindert wird [148]. Die Veränderungen kommen durch eine vermehrte Produktion von ECM durch die RPE-Zellen zustande, die in der Membran auch die Lipide (aus den verstoffwechselten Membranscheibchen der Photorezeptoren) ablagern. Ein anderer Grund für die Verdickung könnte ein verringerter Abtransport der Abbauprodukte durch das Blut sein, da die Kapillargefäße im Alter dünner werden und außerdem die Kapillardichte der Aderhaut abnimmt. Deswegen ist auch die Durchblutung in der Kapillarschicht im Alter geringer, was ein weiterer möglicher Auslöser der AMD ist [45].

Durch die verringerte Diffusion von Sauerstoff über die Bruch-Membran kommt es zu einer Hypoxie der Photorezeptoren, die einen sehr hohen Sauerstoffverbrauch haben und normalerweise 90% - 100% des Blutsauerstoffs aus der Choriokapillaris entnehmen [148]. Als Reaktion auf die Hypoxie produzieren die RPE-Zellen dann den Wachstumsfaktor VEGF (engl. „Vascular Endothelial Growth Factor“), der die Neubildung von Gefäßen aus bereits bestehenden anregt [135]. Die durch das bereits erwähnte entzündliche Geschehen im RPE und in der Bruch-Membran aktivierten dendritischen Zellen rekrutieren Makrophagen, welche wiederum Enzyme sezernieren und damit sowohl die Bruch-Membran als auch RPE-Zellen schädigen. Außerdem sezernieren die aktivierten Makrophagen auch weitere Zytokine (IL-1 β und TNF- α), welche ebenfalls die Sekretion von VEGF fördern, und es kommt zur Bildung neuer Gefäßschlingen, die durch die Bruch-Membran in den subretinalen Raum einwachsen [104]. Dabei produzieren die aktivierten Endothelzellen zunächst Matrixmetalloproteinasen (MMP), welche die Basalmembran des Gefäßendothels perforieren [73]. Durch die so entstandenen Löcher können die proliferierenden Endothelzellen in das umgebende Gewebe migrieren, das von weiteren MMPs aufgelöst wird, um Platz für die sprossenden Gefäße zu schaffen [71].

Da die Gefäßwände dieser neuen Adern aufgrund fehlender Perizyten nicht stabil genug sind, kann es leicht zu einer subretinalen Blutung kommen [101]. Blut unter der Netzhaut wirkt toxisch auf die äußere Retina, da sich ein Blutgerinnsel ausbildet, das den Austausch von Metaboliten zwischen RPE und den Photorezeptorzellen verhindert. Außerdem kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Photorezeptoren und Fibrin, so dass bei der Retraktion des Blutgerinnsels Zugkräfte entstehen und die äußere Netzhaut geschädigt wird. Des Weiteren kann beim Abbau des Blutgerinnsels freigesetztes Eisen die Funktion von Enzymen stören und somit ebenfalls toxisch wirken [87].

Die beschriebenen Vorgänge treten im Alter auch auf, ohne dass sich eine Altersbedingte Maculadegeneration ausbildet. Daher spielen wahrscheinlich auch genetische Faktoren und Umwelteinflüsse eine Rolle. Ein genetischer Einfluss wird durch vergleichende Studien an Familien belegt, wonach Verwandte von AMD-Patienten ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung haben als Verwandte von Gesunden. Außerdem sind Erstere schon in jüngeren Jahren von der Krankheit betroffen [26].

3. Drug Delivery am Auge

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten für die Verabreichung von Arzneistoffen am Auge, von denen die drei wichtigsten die topische Anwendung, die periokulare und die intraokulare Injektion sind [115]. Topische Arzneiformen zur Anwendung auf der Augenoberfläche sowie deren Anforderungen werden im Europäischen Arzneibuch (EuAB) beschrieben. Dazu zählen Augentropfen, Augenbäder, halbfeste Zubereitungen und Augeninserte [32]. Diese Arzneiformen sollen die Wirkstoffe im Allgemeinen im vorderen Augensegment zur Wirkung bringen.

Den Augentropfen kommt dabei wegen ihrer guten Verträglichkeit und der relativ leichten Anwendung sicher die größte Bedeutung zu. Allerdings haben Wirkstoffe, die mittels Augentropfen appliziert werden, wegen der anatomischen und physiologischen Besonderheiten am Auge eine schlechte Bioverfügbarkeit. Im Allgemeinen werden weniger als 3% der applizierten Dosis ins Kammerwasser resorbiert [54]. Der größte Teil davon geht unmittelbar nach der Applikation in den Bindehautsack verloren, da dieser nur etwa 20 µl an zusätzlichem Volumen aufnehmen kann [113]; der Rest des Tropfens läuft normalerweise über den Lidrand auf die Wange. Außerdem reagiert das Auge auf das unphysiologisch große Flüssigkeitsvolumen mit einem verstärkten Tränenfluss, so dass die restliche Dosis zum einen schnell verdünnt wird, zum anderen aber auch über die Tränenkanälchen ausgespült wird, bis das physiologische Volumen von etwa 7-10 µl wieder hergestellt ist [108; 115]. Um diese kurze Kontaktzeit der Augentropfen auszugleichen, müssen sie mehrmals am Tag appliziert werden. Daraus resultiert ein pulsierendes Konzentrations-Zeit-Profil mit hohen Wirkstoffkonzentrationen kurz nach der Applikation und mit Konzentrationen, die zwischen zwei aufeinander folgenden Applikationen unter die minimale effektive Konzentration abfallen können [115]. Dagegen führen Arzneiformen, die über eine längere Zeitspanne im Auge verweilen, zu gleichmäßigeren Wirkstoffspiegeln [120].

Eine verlängerte Kontaktzeit kann in begrenztem Maße durch eine Erhöhung der Viskosität erreicht werden. Aber auch hydrophile Gele werden relativ schnell verdünnt und aus dem Auge ausgespült. Daher ist die Verwendung von hydrophoben Augensalben vorteilhafter, da sich diese nicht mit dem Tränenfilm mischen. Sie können den Wirkstoff über eine längere Zeit freisetzen, wobei jedes Blinzeln dabei hilft, die Salbe über die Augenoberfläche zu verteilen. Wegen der im EuAB geforderten Reizlosigkeit sind dem Technologen bei der Formulierung von Augensalben Grenzen gesetzt. Vor allem Emulgatoren können die Augen reizen, weswegen als Grundlagen für Augensalben fast ausschließlich Kohlenwasserstoffe mit

cholesterinhaltigen Emulgatoren verwendet werden, die sich schon seit Jahren als gut verträglich erwiesen haben. Der gravierendste Nachteil der undurchsichtigen Augensalben ist die Einschränkung des Sehvermögens. Daher werden sie in der Regel nur nachts angewendet [29].

Um diesen Nachteil zu umgehen und um vor allem die Kontaktzeit noch weiter zu verlängern, werden Augeninserte verwendet. Je nach Art des Inserts kann so eine gleichmäßige Freisetzung über mehrere Tage erreicht werden. Eine lange Verweildauer in der Tränenflüssigkeit ist gerade für Wachstumsfaktoren wie EGF wichtig, da diese erst nach mehreren Stunden ihren maximalen Effekt auf die Zellen ausüben [48].

Mit Injektionslösungen können Arzneistoffe in den vorderen Augenabschnitt verabreicht werden, deren Diffusion zu ihrem Wirkort zu lange dauern würde. Vor allem werden auf diese Art und Weise Antibiotika verabreicht, die periokular (meist unter die Bindehaut) oder direkt in die vordere Augenkammer injiziert werden [29]. Um Arzneistoffe effektiv im hinteren Augenabschnitt zur Wirkung zu bringen, werden sie zurzeit als Lösung direkt in den Glaskörperraum (intravitreal) injiziert. Da häufige intravitreale Injektionen mit erheblichen Risiken behaftet sind [146], werden derzeit verschiedene Möglichkeiten für Drug Delivery Systeme mit verlängerter Freisetzung im Glaskörperraum erforscht.

3.1 Augeninserte

Nach Europäischem Arzneibuch sind Augeninserte feste (oder halbfeste) Arzneiformen, die in den Bindehautsack eingelegt werden und den Wirkstoff über einen bestimmten Zeitraum freisetzen. Der Wirkstoff kann dabei entweder in einer Matrix inkorporiert vorliegen oder von einer die Freisetzung kontrollierenden Membran umschlossen sein [32]. Wie bei Augensalben bewirkt die im Vergleich zu Augentropfen verlängerte Freisetzung eine gleichmäßigere Wirkstoffkonzentration in der Tränenflüssigkeit oberhalb der minimalen effektiven Konzentration ohne die unerwünschten Konzentrationsspitzen, die nach der Applikation von Augentropfen auftreten. Ein weiterer Vorteil gegenüber Augentropfen ist die verbesserte Stabilität des Wirkstoffes in den trockenen Augeninserten [119]. Diese haben aber noch mehr Vorteile: So führen sie im Gegensatz zu Augensalben nicht zu verschwommenem Sehen, der Wirkstoff kann, da sie als Einzeldosen verpackt werden, genauer dosiert werden, die Freisetzung erfolgt konstanter und sie sind frei von Konservierungsmitteln [120]. Der gravierendste Nachteil dieser Darreichungsform ist das während der Anwendung auftretende Fremdkörpergefühl, das vor allem nach einer Bewegung des Inserts auf der Augenoberfläche auftritt. Die zunehmende Anwendung von Kontaktlinsen dürfte aber dazu führen, dass viele

Patienten schon an feste Gegenstände im Auge gewöhnt sind, so dass sich dieses Problem in Zukunft etwas relativieren könnte [113]. Weitere Nachteile sind die Möglichkeit des Insertverlusts und die kompliziertere Anwendung, die vor allem für ältere Patienten ein Problem darstellen dürfte. Daher haben sich Augeninserte, trotz ihrer therapeutischen Vorteile, bislang nie richtig durchgesetzt [113].

Die wissenschaftliche Literatur teilt Augeninserte in zwei Gruppen ein, die unlöslichen und die löslichen bzw. erodierbaren Inserte [119]. Beide haben Vor- und Nachteile. So werden die löslichen Augeninserte als besser verträglich angesehen, da sie während der Anwendung allmählich kleiner werden und somit das Fremdkörpergefühl im Auge nachlässt. Außerdem müssen diese Inserte, im Gegensatz zu den unlöslichen nicht wieder durch den Patienten oder Augenarzt entnommen werden. Die unlöslichen Inserte haben den Vorteil der konstanteren Wirkstoffabgabe, die zudem leichter gesteuert werden kann, da sie unabhängiger von physiologischen und damit variablen Vorgängen am Auge ist. Außerdem wird der Verlust eines unlöslichen Inserts leichter vom Patienten bemerkt als der eines löslichen [7].

Abhängig von ihrem Aufbau verzögern Augeninserte die Freisetzung des Wirkstoffs auf verschiedene Art und Weise. So kann die Diffusion des Wirkstoffes aus unlöslichen Inserten durch eine Membran kontrolliert werden oder direkt durch eine Matrix erfolgen [76]. Der erste Fall wurde beim sogenannten Ocusert[®] realisiert. Dieses Augeninsert besteht aus einem Wirkstoffreservoir, das oben und unten von einer unlöslichen Membran aus Polyethylenvinylacetat eingeschlossen und seitlich von einem Ring aus mit Titandioxid eingefärbtem Polyethylenvinylacetat abgedichtet wird. Solange die Wirkstoffkonzentration im Inneren des Inserts gleich bleibt, setzt dieses den Wirkstoff konstant nach nullter Ordnung frei [6], wobei die Freisetzung über die Dicke und Art der Membran gesteuert werden kann. Die früher auf dem Markt erhältlichen Pilocarpin-Inserte konnten eine Woche lang im Auge verbleiben und sorgten während dieser Zeit für einen gleichmäßigen Wirkstoffspiegel [29]. Ein Nachteil der membrangesteuerten Systeme ist die Gefahr des „dose dumpings“, bei dem es durch eine Ruptur der Membran zur schlagartigen Freisetzung der gesamten Dosis kommt.

Im zweiten Fall wird die Diffusion des Wirkstoffes durch eine unlösliche Matrix kontrolliert. Bei Kontakt mit Wasser quillt diese und ermöglicht so die Freisetzung des Wirkstoffes. Dabei kann die Geschwindigkeit der Quellung die Freisetzungsgeschwindigkeit beeinflussen. Da die Wirkstoffmoleküle im Inneren des Inserts außerdem einen weiteren Weg zurücklegen müssen als die am Rand, wird die Freisetzungsgeschwindigkeit mit der Zeit abnehmen [76]. Die Freisetzung aus unlöslichen Augeninserten vom Matrixtyp wird demnach sowohl von der Quellung der Matrix als auch durch die Wirkstoffdiffusion innerhalb der

gequollenen Matrix kontrolliert. Ein Beispiel für solche Augeninserte sind hydrophile Kontaktlinsen, die vor ihrer Anwendung mit einer Wirkstofflösung getränkt werden. Da diese im gequollenen Zustand ins Auge eingesetzt werden, verlangsamen sie die Freisetzung nur leicht um etwa 20 min [119]. Außerdem sind Kontaktlinsen aufgrund ihrer Positionierung im Auge vor allem für die Behandlung von Hornhautproblemen (z. B. Infektionen) geeignet [18], weniger für Erkrankungen der gesamten Augenoberfläche.

Lösliche Augeninserte, bestehend aus einer wasserlöslichen Polymermatrix, quellen zunächst bei Kontakt mit der Tränenflüssigkeit. Der Wirkstoff wird auch schon während der Quellung (wie oben beschrieben) aus der Matrix diffundieren. Im Anschluss an die Quellung löst sich das Polymer in der Flüssigkeit auf und das Insert verschwindet [119]. In der Literatur werden zahlreiche Beispiele für lösliche Augeninserte beschrieben. Zum Beispiel wurde versucht, Wirkstoffe mittels Kollagenschilden zu verabreichen, die normalerweise ohne Wirkstoffe als eine Art „Hornhautverband“ benutzt werden. Diese lösen sich je nach Präparat innerhalb von 12 bis 72 h im Auge auf. Allerdings beeinträchtigen sie das Sehvermögen deutlich, da sie im Gegensatz zu Kontaktlinsen nicht optisch klar sind. Ein weiterer Nachteil ist, dass sie nicht vom Patienten selbst eingesetzt werden können [52; 119]. Die meisten löslichen Augeninserte werden als kleine Scheiben unterschiedlicher Größe aus einem getrockneten Polymerfilm ausgestanzt. Als Polymer können dabei zum Beispiel Polyvinylalkohol, Hydroxypropylcellulose oder Polyacrylamid verwendet werden. Auf Letzterem beruht das sogenannte „SODI“ (engl. für „Soluble Ophthalmic Drug Insert“), das sich innerhalb einer Stunde im Tränenfilm löst. Das Fremdkörpergefühl verschwindet dabei schon nach etwa 5-15 min, obwohl das ovale Insert mit 9 mm Länge und 4,5 mm Breite recht groß ist [7; 120]. Um die Form der Augeninserte zu optimieren, wurde mit einer leicht gewölbten Scheibe („Minidisc“) und der Stabform (Lacrisert®) experimentiert. Nur Lacrisert® kam in Amerika als wirkstofffreies Augeninsert zur Behandlung des Trockenen Auges auf den Markt, wobei das langsam in Lösung gehende Polymer den Tränenfilm stabilisieren soll [120]. Allerdings kann es bei der Anwendung zu Sichtbehinderungen durch Bildung von Schlieren kommen [7].

3.2 Drug Delivery am hinteren Augenabschnitt

Einen Arzneistoff im hinteren Augensegment zur Wirkung zu bringen ist deutlich schwerer als am vorderen. Die Applikation von Arzneistoffen auf der Augenoberfläche ist für diesen Zweck durch die verschiedenen anatomischen und physiologischen Barrieren nur wenig effektiv. Arzneistoffe können zwar über die Cornea aufgenommen werden, allerdings kommt

es dann durch den Kammerwasserfluss schnell wieder zur Elimination aus den intraokulären Geweben. Alternativ können sie auch über die Bindehaut resorbiert werden und anschließend durch die Sklera in den Glaskörperraum diffundieren [54]. Die derzeit zur Therapie der AMD verwendeten Antikörper sind allerdings sehr groß (150kDa), so dass deren Aufnahme durch das Hornhautepithel verhindert wird und auch die Resorption über Binde- und Lederhaut nicht möglich ist. Dabei stellt die Bindehaut die eigentliche Barriere dar, weil in der Sklera eine Diffusion auch von größeren Proteinen möglich ist [75].

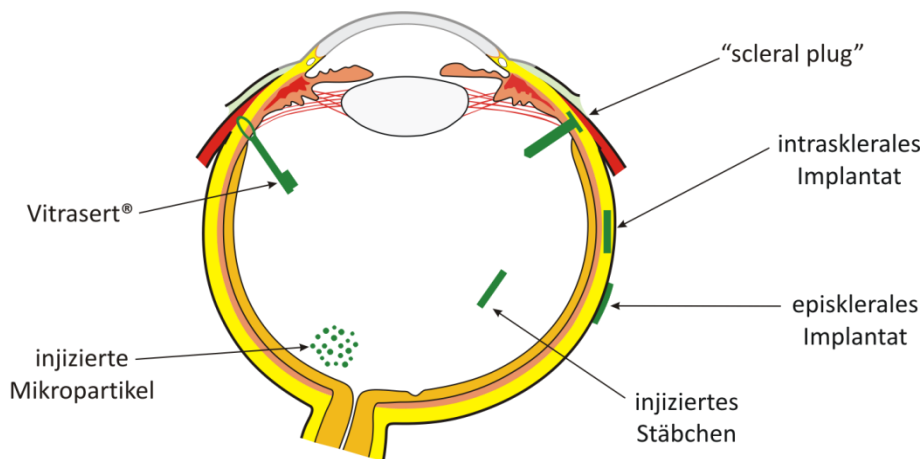


Abb. 6: Verschiedene Applikationsorte von okulären Implantaten (nach [145]).

Damit die Wirkstoffe also die Retina erreichen, müssen sie direkt in den Glaskörper eingebracht werden. Am einfachsten geht das durch die intravitreale Injektion einer Lösung. Allerdings nimmt die Konzentration der Wirkstoffe im Glaskörper relativ schnell wieder ab und für eine erfolgreiche Therapie werden weitere Injektionen notwendig [146]. Bei der gegenwärtigen Therapie der AMD mit Anti-VEGF-Antikörpern muss die Lösung in vierwöchigem Abstand reinjiziert werden [63]. Da jede intraokuläre Injektion Risiken birgt (es kann zum Beispiel zu Netzhautablösungen, Blutungen in den Glaskörper oder im schlimmsten Fall zu einer Endophthalmitis kommen [146]) sind langsam freisetzende Systeme in diesem Bereich von besonderem Nutzen. Intraokuläre Implantate sind eine Möglichkeit, die Freisetzung zu verzögern. Auf dem amerikanischen Markt sind nicht-abbaubare Implantate zugelassen, die durch einen Schnitt in der Pars plana ins Auge eingebracht werden und hier fest vernäht werden. Diese setzen die enthaltenen Wirkstoffe über mehrere Monate frei und müssen danach wieder entnommen werden [145]. Um die zweite Operation zu vermeiden wurden Implantate aus hydrophoben, abbaubaren Polymeren entwickelt, die in verschiedene Formen, wie zum Beispiel Stäbchen oder kleine Scheiben gebracht werden und an

verschiedenen Orten im Auge implantiert werden können (s. Abb. 6) [145]. Zum Beispiel bestehen diese aus PLGA (engl. „Poly (lactic-co-glycolic acid)“), einem hydrolytisch abbaubarem Copolymer aus Milchsäure- und Glykolsäure-Einheiten. In Tierversuchen erwiesen sich Mikropartikel aus PLGA, die den Vorteil der einfachen Applikation mittels Injektion haben, als gut verträglich. Es bleibt allerdings unklar, ob diese die Sicht beeinträchtigen oder nicht, außerdem wären sie nur schwer wieder zu entfernen, wenn die Therapie frühzeitig abgebrochen werden muss [100].

Eine weitere Form können sogenannte „scleral plugs“ sein, das sind kleine stäbchen- oder T-förmige Implantate [46; 146], die als Verschluss in eine kleine Inzision der Lederhaut gesteckt werden können. Diese verbleiben am Applikationsort und lösen sich dort langsam auf, während sie den Wirkstoff kontinuierlich freisetzen. Sie eignen sich allerdings nicht für Proteine, da das Polymer-Wirkstoff-Gemisch während der Herstellung erhitzt werden muss, um es in die gewünschte Form zu pressen [144].

In Form einer Scheibe können Implantate auch außerhalb des Augapfels auf die Sklera gelegt oder innerhalb der Lederhaut platziert werden. Wegen der relativ guten Durchlässigkeit der Sklera gerade für kleinere Arzneistoffe können auf diese Weise auch im Glaskörperraum ausreichende Wirkstoffspiegel erreicht werden [39].

Auch quervernetzte Hydrogele können zur Retardierung verwendet werden, wobei sie sich gerade für Proteine gut eignen. Um die Proteine auch im gequollenen Gel zurück zu halten, werden Polymere verwendet, die eine dem Protein entgegengesetzte Ladung tragen, so dass ein Polyionenkomplex entsteht. Dieser Komplex ist stabil genug, um eine Kontrolle der Freisetzung über den Abbau der Matrix zu erreichen [146].

Ein vollkommen anderer Ansatz ist der teilweise oder vollständige Ersatz des Glaskörpers durch ein Hydrogel, das gleichzeitig als Vehikel für Protein-Wirkstoffe dient. Das verwendete Hydrogel muss optisch transparent sein, damit das Sehvermögen des Patienten nicht beeinträchtigt wird. Erste Versuche zu einem solchen System mit Bevacizumab als Wirkstoff werden in dieser Arbeit vorgestellt. Bevacizumab ist ein gegen VEGF gerichteter Antikörper, der bei der Altersbedingten Maculadegeneration eingesetzt wird. Da die derzeit praktizierte Anwendung als intravitreale Injektion alle 4-6 Wochen wiederholt werden muss, würde sich ein System mit verzögerter Freisetzung als Therapieverbesserung anbieten.

4. Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Systeme zur Verabreichung von Protein-Arzneistoffen am Auge entwickelt: Ein lösliches Augeninsert zur Anwendung im Bindehautsack um EGF gegen Trockene Augen zu verabreichen und ein Drug Delivery System für die intraokuläre Anwendung, mit dem der Antikörper Bevacizumab gegen AMD verabreicht werden soll. Damit die Anwendung durch die Patienten möglichst einfach erfolgen kann und zu erwartende Verträglichkeitsprobleme von Anfang an möglichst gering gehalten werden, löst sich das Augeninsert während der Anwendung langsam auf. Das intravitreale Drug Delivery System soll den Antikörper möglichst lange freisetzen, um wiederholte Applikationen, wie sie zurzeit üblich sind, zu vermeiden.

Kapitel 3 befasst sich mit der Herstellung von Augeninserten auf Basis von Alginaten. Da die Inserte ausgestanzt werden, sollte die Matrix in möglichst einheitlicher Schichtdicke vorliegen. Zwei Methoden wurden etabliert, um dieses Ziel zu erreichen: Das Ausziehen der Lösung zu Filmen und das Ausgießen von weniger konzentrierten Filmen in Teflonformen. Dabei wurden auch zwei Methoden zur Quervernetzung der Alginatmatrix verwendet, die auf der äußeren und der inneren Gelierung beruhen. Um das Fremdkörpergefühl während der Anwendung der Augeninserte zu minimieren, wurde der Matrix Glycerol als Weichmacher zugefügt. Dessen Einfluss auf die Schichtdicke, den Wassergehalt und vor allem auf die mechanischen Eigenschaften der Alginatmatrix wurde untersucht. Da für Augenarzneimittel Sterilität gefordert wird, wurden auch zwei Sterilisationsmethoden auf ihre Anwendbarkeit für Alginat geprüft. Die Untersuchung erfolgte am Rotationsviskosimeter, mit dem eine Änderung der Viskosität leicht festgestellt werden kann.

Die Quervernetzung der Alginatmatrix erfolgte mit Ca^{2+} -Ionen und war notwendig, da sich ansonsten das Augeninsert zu schnell in der Tränenflüssigkeit auflösen würde. Die beiden verwendeten Methoden zur inneren Gelierung von Alginat wurden am oszillierenden Rheometer genauer untersucht. Dabei wurde die Gelbildung von zwei unterschiedlichen Alginattypen („G-reich“ und „G-arm“) charakterisiert und der Einfluss der Ca^{2+} bzw. GDL-Menge getestet. Da bei der Methode mit $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ der pH-Wert eine entscheidende Rolle spielt, wurde auch dessen Einfluss auf die Gelierungsdauer untersucht (**Kapitel 4**).

Die Augeninserte sollen sich während der Applikation im Auge auflösen. Da die Auflösung eines quervernetzten Alginatgels sehr lange dauert und normalerweise nur bei großem Überschuss an Natriumionen stattfindet, sollten die entwickelten Augeninserte durch Zugabe des Komplexbildners EDTA in situ erodierbar gemacht werden. In **Kapitel 5** werden

die entsprechenden in vitro Versuche beschrieben, bei denen zunächst der Komplexbildner von außen zugetropft wurde. Des Weiteren wurden sowohl das lösliche Na₂-EDTA als auch das unlösliche H₄-EDTA in die Matrix der Augeninserte inkorporiert, damit diese sich auch ohne eine externe Zufuhr von EDTA auflösen. Zuletzt wurde die Erosion der mit der CaCl₂/Na₂-EDTA-Methode hergestellten Augeninserte überprüft. Dabei wurde speziell der Einfluss der verwendeten GDL-Konzentration untersucht.

EGF ist als Peptid ein sehr empfindlicher Arzneistoff, dessen Stabilität gleichzeitig für seine Wirkung von großer Bedeutung ist. Da während der Herstellung das Peptid lange Zeit in Lösung vorliegt, kann es leicht zu Abbaureaktionen kommen. Das Ausmaß dieser Reaktionen während der Herstellung wurde mittels chromatographischer Methoden bestimmt; die Identifizierung der Abbauprodukte erfolgte dann mit Hilfe von Massenspektren der gesammelten Fraktionen (**Kapitel 6**). Untersucht wurden die äußere Gelierung, bei der zwei Trocknungsschritte notwendig sind, und die beiden Methoden der inneren Gelierung (mit CaHPO₄/GDL und mit CaCl₂/Na₂-EDTA). Ebenfalls in diesem Kapitel werden die Untersuchungen zur Freisetzung von EGF aus den Inserten beschrieben. Dazu wurden zwei unterschiedliche Methoden etabliert: eine Eintopfmethod, bei der die Inserte in 5 ml Puffer inkubiert wurden und eine Durchflusszelle, bei der die Inserte von ständig frischem Puffer umspült wurden. Mit deren Hilfe wurden die Monomerenzusammensetzung und Kettenlänge des verwendeten Alginats sowie die zur Herstellung verwendete Alginatkonzentration als verschiedene Möglichkeiten zur Beeinflussung der Freisetzung getestet.

Im **siebten Kapitel** werden die Versuche zur Entwicklung eines Drug Delivery Systems beschrieben, das den Antikörper Bevacizumab im Glaskörperraum über einen möglichst langen Zeitraum freisetzen sollte. Am Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg wurde ein in situ gelierendes Hydrogel aus zwei Komponenten entwickelt, das als Glaskörperersatz über eine Kanüle ins Auge appliziert werden kann. Eine Komponente dieses Gels ist aminreaktiv, trotzdem sollte das Gel mit Antikörpern gegen VEGF beladen werden. Um eine kovalente Anbindung des Proteins an das Polymergerüst des Gels zu verhindern, wurde der Wirkstoff durch Zugabe von löslichem Polyethylenglykol (PEG) ausgefällt. Die dazu benötigte Konzentration von löslichem PEG wurde anhand von drei verschiedenen PEGs mit unterschiedlicher Kettenlänge bestimmt. Danach wurde am oszillierenden Rheometer der Einfluss dieses zusätzlichen PEGs auf die Gelbildung des in situ gelierenden Gels untersucht. Die Eignung dieses Gels als Drug Delivery System wurde sowohl mit fluoreszenzmarkierten IgG-Antikörpern als auch mit dem Wirkstoff Bevacizumab untersucht. Dabei wurden die Art und Menge des zur Präzipitation eingesetzten PEGs variiert.

Kapitel 2

Materialien und Methoden

1. Materialien

Die zur Herstellung der Augeninserte verwendeten Alginat wurden von der Firma FMC BioPolymer bezogen. Es wurden drei verschiedene Alginattypen benutzt, die in Tab. 1 aufgeführt sind. Neben der Bezeichnung enthält die Tabelle auch den Guluronsäuregehalt der Alginattypen und die Viskosität einer 1%igen Lösung des entsprechenden Alginats in Wasser, die als Maß für die Kettenlänge der Polysaccharide dient. Die Reinheit der beiden niedrigviskosen Alginattypen entsprach den Anforderungen des EuAB.

Alginat-bezeichnung	Guluronsäure-gehalt (%)	Viskosität (mPas) (1% in Wasser)
LF10/60	65-75	20-70
LF10/60LS	35-45	20-70
LF200S	65-75	200-400

Tab. 1: Guluronsäuregehalt und Viskosität der verwendeten Alginat.

Calciumchlorid-Dihydrat, Dinatriumedetat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) und wasserfreies Glycerol zur Herstellung der Alginatmatrix wurden von Merck bezogen, Calciumhydrogenphosphat-Dihydrat von Fluka, Glucono- δ -lacton und Ethylendiamintetraessigsäure ($\text{H}_4\text{-EDTA}$) von Sigma-Aldrich.

Rekombinant hergestellter humaner epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) wurde in zwei verschiedenen Qualitäten gekauft. Vom „*Center for Genetic Engineering and Biotechnology*“ in Havana (Kuba) stammte EGF, das zur Anwendung am Menschen zugelassen war. Dieses wurde in Form einer Lösung importiert, die 0,8 mg/ml Peptid enthielt. Im Folgenden wird diese als „EGF-Kuba“ bezeichnet. Von der Firma Biomol GmbH in Hamburg wurde EGF in einer nur zu Forschungszwecken, aber nicht zur Anwendung am Menschen zugelassenen Qualität erworben. Dieses lag als gefriergetrocknetes Protein ohne weitere Zusätze vor und wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in Aqua ad iniectabilia (Firma Bayer AG) gelöst. Diese EGF-Sorte wird im Folgenden als „EGF-Biomol“ bezeichnet.

Der Puffer für die Erosions- und Freisetzungsversuche wurde mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Salzsäure und Natriumchlorid von Merck hergestellt. α -Cyano-4-hydroxymethylsäure wurde in reiner Form als Matrixsubstanz für MALDI-MS Untersuchungen von Fluka gekauft. Für die HPLC-Analysen wurde Acetonitril und Methanol in HPLC-Qualität von Merck, Trifluoressigsäure (TFA) von Riedel-de Haën gekauft. Borsäure und Carbazol für den Alginatnachweis stammten von Merck.

Bevacizumab (Handelsname Avastin[®]) wurde freundlicherweise von der Apotheke des Klinikums der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt. Jeweils 0,15 ml der Lösung (25 mg/ml) wurden von der Apotheke unter aseptischen Bedingungen in Einmalspritzen abgefüllt, steril verpackt und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Verzweigte PEG-succinimidylpropionate und verzweigte PEG-amine wurden als Ausgangssubstanzen für die in situ gelierenden PEG-Hydrogele am Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg synthetisiert [10]. PEG400, PEG2000 und PEG10000, die als zusätzliches Polyethylenglykol für die Ausfällung von Proteinen genutzt wurden, stammten von Fluka. Bovines γ -Globulin und Fluoreszenz-markiertes humanes Immunglobulin G (FITC-IgG) wurden von Sigma-Aldrich gekauft.

Wasserfreies Natriumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat wurden als Puffersubstanzen von Sigma-Aldrich gekauft, zur Konservierung des Freisetzungspuffers wurde Natriumazid von Merck benutzt.

Alle verwendeten Substanzen waren, falls nicht anders angegeben, von analytischer Reinheit oder besserer Qualität.

2. Methoden

2.1 Herstellung von Augeninserten auf Alginatbasis

Die Herstellung der Augeninserte erfolgte durch einfaches Ausstanzen aus einer filmförmigen, quervernetzten Alginatmatrix. Zur Quervernetzung der Matrix wurden die im Folgenden beschriebenen Methoden eingesetzt.

2.1.1 Quervernetzung durch äußere Gelierung

Zur Herstellung der Matrices wurden die verschiedenen Alginat über Nacht in bidestilliertem Wasser gelöst und dann entweder in eine Teflonform gegossen oder mit Hilfe des Filmziehgerätes (Coatmaster 509/MC-I, Firma Erichsen) zu dünnen Filmen ausgezogen (vgl. Abb. 7).

Für das **Filmziehgerät** wurden relativ viskose Lösungen von 4% des hochviskosen Alginats LF200LS und jeweils 8% der beiden niedrigviskosen Alginat LF10/60 und LF10/60LS verwendet. Diese Lösungen wurden mit einer Geschwindigkeit von 25 mm/s auf einer Glasunterlage zu 1000 µm dicken Filmen ausgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Trocknung wurden die Filme exakt waagrecht ausgerichtet, damit die Lösungen nicht fließen konnten, was zu ungleichmäßigen Filmen geführt hätte. Um dickere Filme zu erhalten, wurden nach dem Trocknen weitere Schichten aufgetragen.

Für die **Teflonformen** wurden, unabhängig von der Kettenlänge, ein- oder zweiprozentige Lösungen der Alginat verwendet. Diese konnten bei Bedarf sterilfiltriert werden. Von den Lösungen wurden jeweils 3,8 ml in eine Teflonform von 4 cm Durchmesser gegossen und ebenfalls über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Auch die Teflonformen wurden während der Trocknung waagrecht ausgerichtet.

Die trockenen Filme wurden dann vorsichtig von der Glasplatte gelöst bzw. aus der Teflonform genommen und zur Quervernetzung eine Minute lang in eine 5%ige (m/V) CaCl_2 -Lösung getaucht. Anschließend wurden die Filme kurz mit bidestilliertem Wasser abgespült und zur Trocknung auf Glasplatten ausgebreitet. Aus diesen getrockneten und quervernetzten Filmen wurden runde Inserte mit 5 mm Durchmesser ausgestanzt.

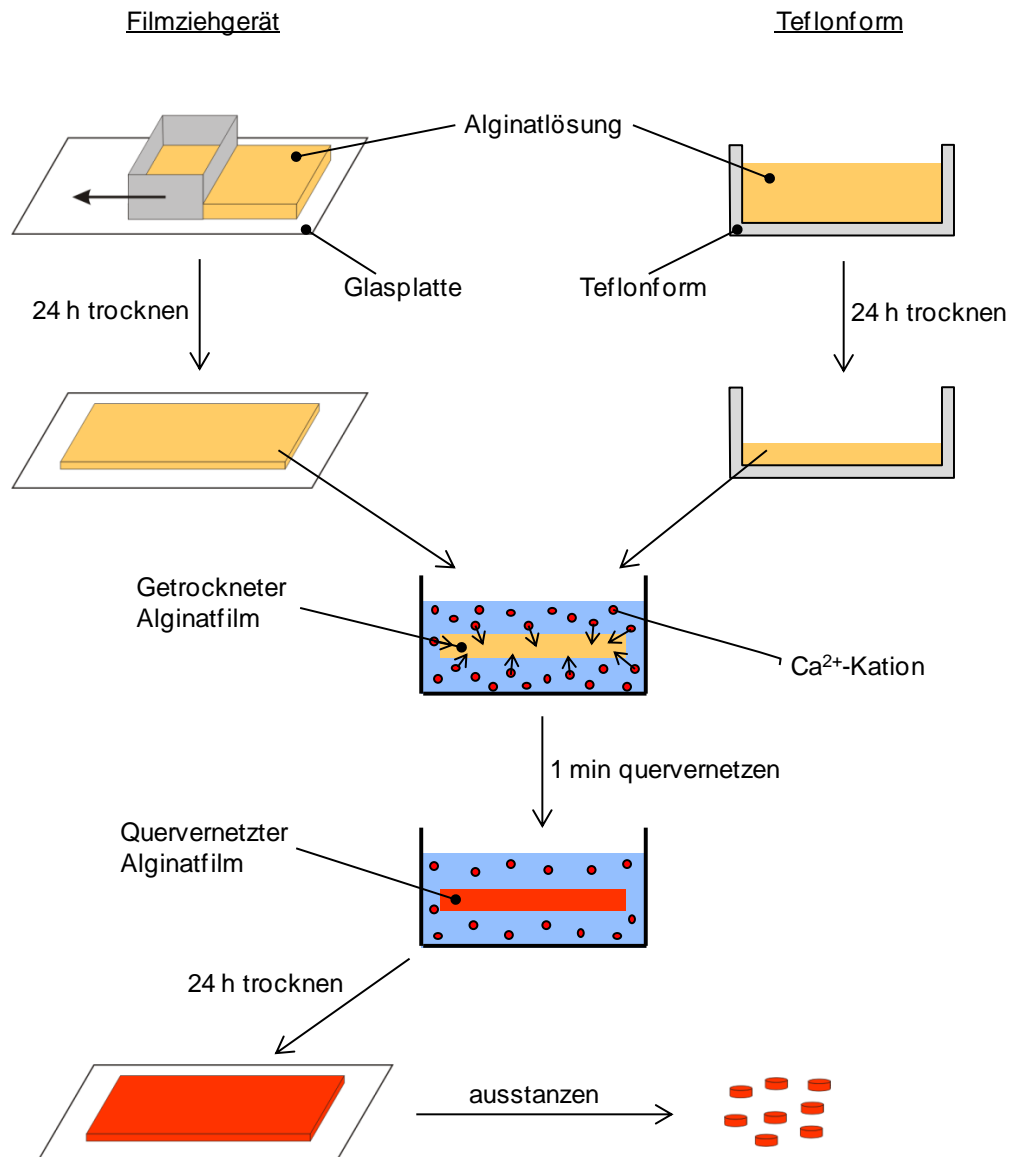


Abb. 7: Herstellung von Augeninserten mit Hilfe der äußeren Gelierung.

2.1.2 Quervernetzung durch innere Gelierung

Auch für die innere Gelierung wurden die Alginatlösungen entweder zu Filmen gezogen oder in Teflonformen ausgegossen. Die Quervernetzung erfolgte dann von innen heraus entweder mit der $\text{CaHPO}_4/\text{GDL}$ -Methode oder durch die Verwendung von CaCl_2 und $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (im Folgenden auch $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Methode genannt). Auch hier wurden 8%ige Lösungen der niedrigviskosen Algintypen für das Filmziehgerät und ein- bis zweiprozentige Alginatlösungen für die Teflonformen benutzt.

Bei der **$\text{CaHPO}_4/\text{GDL}$ -Methode** wurde CaHPO_4 in Glycerol suspendiert und anschließend mit der jeweiligen Alginatlösung gemischt, so dass die entstandene Suspension 0,2% CaHPO_4 enthielt. In dieser Suspension wurden 0,4% Glucono- δ -lacton (GDL) gelöst

und eine Minute lang gerührt, um es homogen zu verteilen. Diese fertige Suspension wurde entweder in Teflonformen gegossen (3,8 ml in eine Form von 4 cm Durchmesser) oder mit einer Geschwindigkeit von 25 mm/s zu 1000 µm dicken Filmen ausgezogen. Während der Trocknung hydrolysiert GDL und verringert den pH-Wert der Suspension, so dass sich das CaHPO_4 löst (vgl. Abb. 8) und somit das Alginat quervernetzt wird. Die Trocknung erfolgte auch hier bei Raumtemperatur.

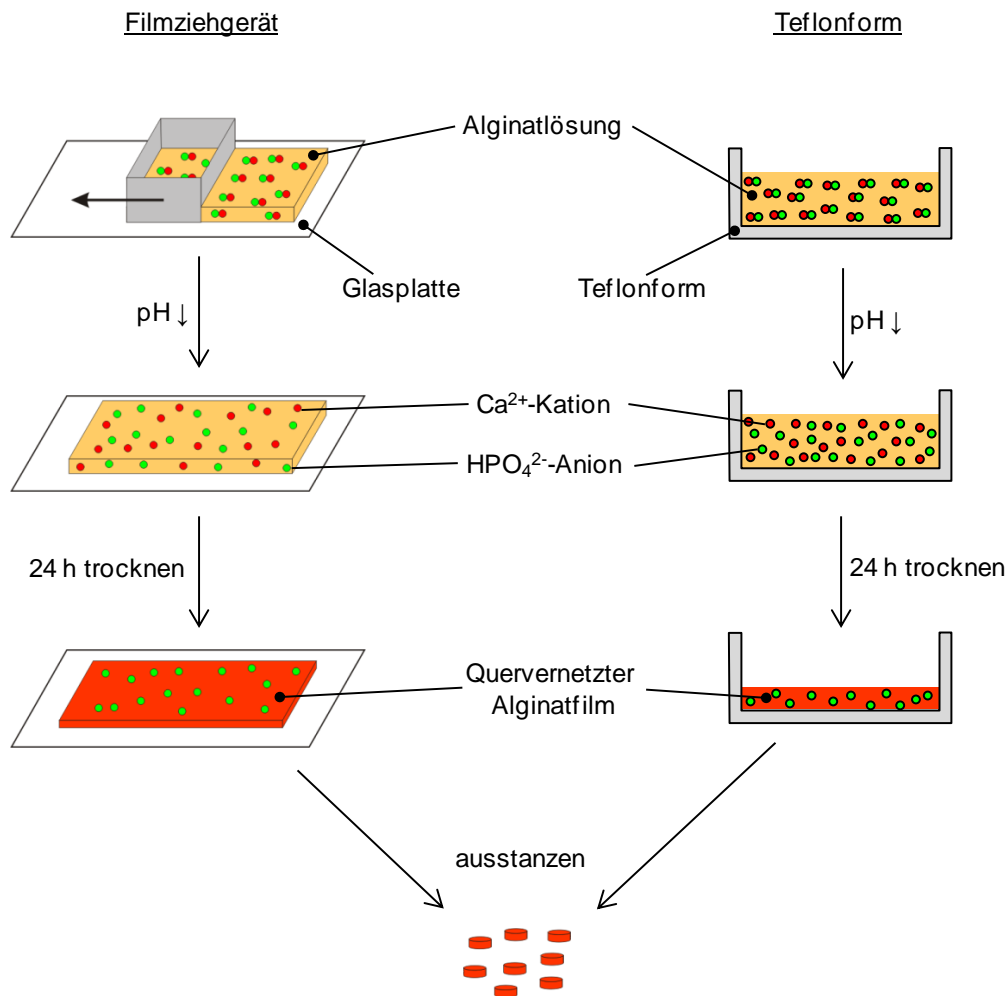


Abb. 8: Herstellung von Augeninserten mit Hilfe der $\text{CaHPO}_4/\text{GDL}$ -Methode zur inneren Gelierung von Alginat.

Bei der **$\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Methode** zur inneren Gelierung konnten alle Bestandteile gelöst werden. Zunächst wurde eine Lösung mit 1% CaCl_2 und 2,6% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ in Wasser hergestellt (die Lösung enthält dann Ca^{2+} -Ionen und Komplexbildner in äquimolarem Verhältnis). Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit 6M Natronlauge auf einen Wert zwischen 7 und 7,5 eingestellt, damit sich ein stabiler Komplex zwischen Ca^{2+} und EDTA ausbilden konnte. In dieser eingestellten $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Lösung wurde 1% Alginat gelöst. Nachdem

das Alginat komplett gelöst war, wurde noch 1% GDL durch einminütiges Rühren darin aufgelöst und die fertige Mischung schließlich sterilfiltriert. Von der fertigen Lösung wurden wiederum 3,8 ml in eine Teflonform von 4 cm Durchmesser gegeben, so dass die Schichtdicke etwa 3 mm betrug. Während der Trocknung bei Raumtemperatur, die bei dieser Methode bis zu 48 h dauert, werden Ca^{2+} -Ionen freigesetzt und das Alginat wird quervernetzt. Aus der getrockneten Matrix konnten die Augeninserte wie oben beschrieben ausgestanzt werden.

2.1.3 Einfluss von Glycerol auf die Alginatfilme

Glycerol wurde den Alginatfilmen als Weichmacher zugesetzt, um die Augeninserte flexibler zu machen und somit das Fremdkörpergefühl während der Anwendung zu minimieren. Die verwendeten Alginatfilme wurden mit der oben beschriebenen $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Methode in Teflonschalen von 6 cm x 10 cm Größe hergestellt. Dazu wurden 18 ml Alginatlösung in die Formen eingefüllt, was einer Füllhöhe von 3 mm entspricht. Es wurden sechs verschiedene Filme mit Glycerol-Konzentrationen von 0% bis 5% hergestellt, indem das Glycerol mit dem trockenen Alginatpulver gemischt wurde. Zur Charakterisierung der Filme wurden deren Schichtdicke und Restfeuchte bestimmt sowie ihre mechanischen Eigenschaften untersucht.

Die Schichtdicke wurde durch eine Magnet-induktive Messung mit einer Genauigkeit von 1 μm bestimmt (MiniTest 600 FN, Firma Elektrophysik). Die Messung erfolgte auf einer Stahlplatte an 20 zufällig ausgewählten Punkten des Films. Aus den Einzelmessungen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Zur Bestimmung der Restfeuchte wurden aus jedem Film 3 Stücke von 9 mm Durchmesser ausgestanzt und gewogen. Diese wurden dann 48 h lang im Trockenschrank bei 80°C gelagert und anschließend erneut gewogen. Aus der Differenz der Wägungen wurde die prozentuale Restfeuchte errechnet.

Die mechanischen Eigenschaften der Filme wurden mit Hilfe eines Zugversuches untersucht (Universalprüfmaschine Typ 5542, Firma Instron). Dazu wurden zunächst 5 x 1 cm große Stücke aus den Filmen ausgeschnitten und deren Dicke gemessen. Diese Stücke wurden dann im Zugversuch mit einer Geschwindigkeit von 20 mm/min bis zum Zerreißen gedehnt. Dabei wurde die Zugspannung gemessen und in einem Spannungs-Dehnungs-Diagramm gegen die Zugdehnung aufgetragen. Aus diesem Diagramm wurde das Elastizitätsmodul der Filme bestimmt.

2.1.4 Einfluss der Sterilisation auf die Alginatlösungen

Zur aseptischen Herstellung der Augeninserte müssen die Ausgangsmaterialien vorher sterilisiert werden. Daher wurde der Einfluss von zwei Sterilisationsmethoden, trockene Hitze und Sterilfiltration, auf die Kettenlänge der beiden niedrigviskosen Alginat (LF10/60 und LF10/60LS) untersucht. Dazu wurden sterile und nicht sterile Lösungen (2%) der beiden Alginat am Rotationsviskosimeter (TA AR2000, Firma TA Instruments) bei 25°C mit einer Platte-Kegel-Geometrie von 60 mm Durchmesser und 2° Öffnungswinkel vermessen. Während der Messung wurde die Schergeschwindigkeit innerhalb von einer Minute kontinuierlich von 0,1 auf 2000 s⁻¹ erhöht und dabei die Viskosität der Lösung aufgezeichnet.

Die Hitzesterilisation der Alginat erfolgte nach den Standardbedingungen des Europäischen Arzneibuchs (2 h, 160°C). Das Pulver wurde dazu in dünner Schicht in einer Glas-Petrischale ausgebreitet und in einem Trockenschrank erhitzt. Während der Sterilisation wurde die Temperatur im Pulverbett gemessen. Nachdem das Pulver wieder auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde daraus eine 2%ige Lösung für die rheologische Untersuchung hergestellt. Die Sterilfiltration der 2%igen Lösung erfolgte über einen sterilen Spritzenvorsatzfilter mit Polyethersulfon-Membran von 0,2 µm Porengröße. Als Vergleich diente hier die restliche, nicht filtrierte Lösung.

2.2 Rheologische Untersuchung der Quervernetzung von Alginaten

2.2.1 Bestimmung der Gelierungsdauer bei Verwendung von CaHPO_4 /GDL

Für die Experimente wurden CaHPO_4 -Dispersionen der in Tab. 2 angegebenen Zusammensetzung nach der in Abschnitt 2.1.2 beschriebenen CaHPO_4 /GDL-Methode hergestellt. Verwendet wurden dazu die beiden niedrigviskosen Alginat (LF10/60 und LF10/60LS). Die benötigte Menge GDL wurde erst unmittelbar vor der Messung in der jeweiligen Dispersion gelöst. Dazu wurde GDL als Feststoff direkt zur Dispersion gegeben und diese dann eine Minute lang gerührt, um das Lacton vollständig zu lösen.

	Alginat	Glycerol	CaHPO_4	GDL*
1	2%	5%	0,2%	0,2%
2	2%	5%	0,2%	0,4%
3	2%	5%	0,4%	0,4%
4	2%	5%	0,4%	0,8%

Tab. 2: Zusammensetzung der am Rheometer untersuchten CaHPO_4 -Suspensionen.

* GDL wurde erst unmittelbar vor der Messung in der Suspension gelöst

Die Quervernetzung der CaHPO_4 -Dispersionen wurde am oszillierenden Rheometer (TA AR2000, Firma TA Instruments) zwischen zwei parallelen Platten von 4 cm Durchmesser untersucht. Sofort nachdem das GDL komplett gelöst war, wurden von der Dispersion 1,3 ml auf die untere Platte gegeben und der Spalt durch absenken der oberen Platte auf 1000 μm eingestellt. Um die Verdunstung von Wasser aus dem Spalt zu minimieren, wurde er während der Messung mit einer Lösungsmittelfalle bedeckt. Vor der eigentlichen Messung wurde das System zwei Minuten lang in Ruhe äquilibriert, damit die Probe die Mess-temperatur von 20°C bzw. 50°C annehmen konnte. Die Messungen erfolgten dann über einen Zeitraum von zwei Stunden bei einer Oszillationsfrequenz von 1 Hz und einem Drehmoment von 10 μNm . Dabei oszillierte die obere Platte kontinuierlich, jedoch wurde nur alle 10 s ein Messwert abgespeichert. Aufgezeichnet wurden das Speichermodul (G'), das Verlustmodul (G'') und die Phasenverschiebung δ gegen die Zeit. Der Kreuzungspunkt der beiden Module wurde als Gelierungsdauer angesehen.

Zusätzlich zur rheologischen Untersuchung wurden von den Proben vor und nach der Gelierung polarisationsmikroskopische Aufnahmen gemacht. Ein Tropfen der jeweiligen Dispersion ohne GDL wurde auf einen Glas-Objektträger gegeben und bei 175-facher

Vergrößerung unter polarisiertem Licht fotografiert (Leica Mikroskop DM IRB mit Nikon Digitalkamera DS-U1). Nach der Gelierung im Rheometer wurde das entstandene Gel auf die gleiche Weise fotografiert.

2.2.2 Bestimmung der Gelierungsdauer bei Verwendung von $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$

Die $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Methode zur Quervernetzung von Alginaten wurde anhand einer Alginatlösung der in Tab. 3 angegebenen Zusammensetzung untersucht. Die Herstellung der Lösung erfolgte wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, GDL wurde erst unmittelbar vor der Messung in der Lösung aufgelöst. Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Gelierung wurden sieben solcher Lösungen hergestellt. Der pH-Wert der $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Lösung wurde auf Werte zwischen 6 und 11 eingestellt, bevor das Alginat darin aufgelöst wurde. Anschließend wurde in der fertigen Alginatlösung nochmals der pH-Wert bestimmt.

Die Bestimmung der Gelierungsdauer erfolgte am oszillierenden Rheometer mit den in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Parametern.

Bestandteil	Konzentration
Alginat (LF10/60)	1%
Glycerol	1%
CaCl_2	1%
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	2,6%
GDL *	1%
Wasser	93,4%

Tab. 3: Zusammensetzung der Alginatlösungen für die rheologische Untersuchung der Quervernetzung mit $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$.

* GDL wurde erst unmittelbar vor der Messung in der Lösung aufgelöst

2.2.3 Bestimmung der Gelstärke in Abhängigkeit von der eingesetzten GDL-Menge

Die verwendeten Alginatlösungen wurden nach der in Abschnitt 2.1.2 beschriebenen $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Methode hergestellt und sterilfiltriert. Die Zusammensetzung entsprach der in Tab. 3 angegebenen Lösung, jedoch zunächst ohne GDL. Dieses wurde erst unmittelbar vor der Messung in 3 ml der Alginatlösung aufgelöst (GDL-Konzentrationen von 0,6%, 0,8%, 1% und 1,5%). Für jede GDL-Konzentration wurden jeweils drei Messungen mit den beiden niedrigviskosen Alginaten LF10/60 und LF10/60LS durchgeführt.

Die Bestimmung der Gelstärke erfolgte ebenfalls am oszillierenden Rheometer. Als Messgeometrie diente hier ein Platte-Platte-System mit 4 cm Durchmesser, dessen Oberflächen

strukturiert waren, um einen festen Kontakt zwischen Messgeometrie und Probe während der Gelstärke-Bestimmung zu gewährleisten. Zum Vergleich der Gelstärke sollte die Gelstruktur in den Proben möglichst komplett ausgebildet sein. Um den Aufbau dieser Struktur zu beschleunigen, erfolgte zunächst die Gelierung der Proben bei 50°C über einen Zeitraum von drei Stunden (bei 0,6% GDL über sechs Stunden). Währenddessen wurden das Speicher- und das Verlustmodul (G' und G'') aufgezeichnet, an deren Verlauf der Aufbau der Gelstruktur gut verfolgt werden kann. Diese Messung erfolgte bei einer Oszillationsfrequenz von 1 Hz und einem Drehmoment von 10 μNm . Als Gelierungsdauer wurde auch hier der Kreuzungspunkt von G' und G'' angesehen.

Nach drei bzw. sechs Stunden wurde die Temperatur auf 25°C verringert, um den linear viskoelastischen Bereich des Gels als Maß für die Gelstärke zu bestimmen. Dazu wurde bei unveränderter Oszillationsfrequenz das Drehmoment kontinuierlich von 1 bis 10000 μNm erhöht und währenddessen der Betrag des komplexen Moduls $|G^*|$ aufgezeichnet. Das Drehmoment am Ende des linear viskoelastischen Bereichs, das durch einen plötzlichen Abfall von $|G^*|$ zu erkennen ist, diente als Maß für die Gelstärke.

2.3 In vitro Studien zur Auflösung der Augeninserte

2.3.1 Inkubationsbedingungen für die Erosionsversuche

Die Versuche zur Auflösung der Augeninserte erfolgten durch einfache Inkubation in einem Schüttelwasserbad (Typ 1086, Firma GFL) bei 37°C. Als Inkubationsmedium dienten 5 ml Trispuffer mit pH 7,4 (genaue Zusammensetzung siehe Tab. 4), weil das Ergebnis in einem Phosphatpuffer durch das Ausfallen von Calciumphosphat verfälscht werden könnte. Jeweils drei Augeninserte wurden einem bestimmten Zeitpunkt zugeordnet und vor der Inkubation gewogen. Die Wägung erfolgte wegen der geringen Masse der Augeninserte als Differenzwägung des vollen und leeren Glasgefäßes. Nach der jeweiligen Inkubationsdauer wurde der Puffer komplett abgesaugt und das Gefäß mit 1 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Das verbleibende restliche Insert wurde mitsamt dem Gefäß 24 h lang bei 40°C im Trockenschrank getrocknet und danach erneut gewogen.

Bestandteil	Menge
Tris	6,057 g
NaCl	3,848 g
HCl (1M)	41 ml
Wasser	ad 1000 ml

Tab. 4: Zusammensetzung des Erosionspuffers.

NaCl diene zur Einstellung der Ionenstärke auf 154 mM.

2.3.2 Tropfenweise Zugabe einer EDTA-Lösung

Zunächst sollte überprüft werden, ob eine quervernetzte, unlösliche Alginatmatrix mit Hilfe von EDTA wieder aufgelöst werden kann. Dazu wurden Augeninserte von 5 mm Durchmesser nach der in Abschnitt 2.1.1 beschriebenen Methode hergestellt. Diese wurden nach der oben beschriebenen Methode (Abschnitt 2.3.1) inkubiert, wobei zu Beginn der Inkubation und nach jeder weiteren Stunde 50 µl einer Na₂-EDTA-Lösung (25 mg/ml) zum Inkubationsmedium gegeben wurden. Als Kontrolle dienten Inserte, die in EDTA-freiem Puffer gleich lange inkubiert worden sind.

2.3.3 Inkorporation von EDTA in die Alginatmatrix

Zur Einarbeitung von EDTA in die Matrix der Augeninserte wurden zwei Formen des Komplexbildners verwendet, das lösliche Dinatriumsalz und die in reinem Wasser unlösliche freie Säure ($\text{H}_4\text{-EDTA}$).

Um einen Kontakt zwischen den Ca^{2+} -Ionen und gelöstem **$\text{Na}_2\text{-EDTA}$** schon während der Quervernetzung zu vermeiden, wurden die Inserte mit dem löslichen Dinatriumsalz aus drei Schichten aufgebaut. Dabei wurde nur in der mittleren, nicht quervernetzten Schicht $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ verarbeitet. Die beiden äußeren Schichten (ohne EDTA) wurden mit der in Abschnitt 2.1.2 beschriebenen $\text{CaHPO}_4/\text{GDL}$ -Methode quervernetzt. Zur Herstellung der Matrix, die in einer Teflonschale erfolgte, wurde jede Schicht erst 24 h lang getrocknet, bevor die nächste darauf gegeben wurde. Die Zusammensetzung der einzelnen Schichten ist in Tab. 5 angegeben. Es wurden Versuche mit zwei unterschiedlich zusammengesetzten Inserten durchgeführt: Beim ersten entsprach die eingesetzte Menge $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ der molaren Menge an Ca^{2+} -Ionen in beiden quervernetzten Schichten, beim zweiten der molaren Ca^{2+} -Konzentration in nur einer der quervernetzten Schichten.

Die Erosion der ausgestanzten Augeninserte mit einem Durchmesser von 5 mm wurde wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben untersucht.

Bestandteil	Äußere Schicht	Mittlere Schicht	
		1. Versuch	2. Versuch
Alginat	2%		2%
Glycerol	5%		5%
CaHPO_4	0,2%		–
GDL *	0,4%		–
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	–	0,865%	0,433%
ddH ₂ O	92,4%	92,135%	92,567%

Tab. 5: Zusammensetzung der Lösungen, aus denen die einzelnen Insertsichten hergestellt wurden.

* GDL wurde als letzte Substanz zugegeben

Da **$\text{H}_4\text{-EDTA}$** in Wasser nicht löslich ist, wurde diese Form von EDTA als Feststoff verarbeitet. Auch dazu wurde die $\text{CaHPO}_4/\text{GDL}$ -Methode aus Abschnitt 2.1.2 verwendet. Die verwendete Menge $\text{H}_4\text{-EDTA}$ entsprach der molaren Menge an Ca^{2+} -Ionen (s. a. Tab. 6). Zur Herstellung der Matrix wurden die festen Bestandteile mit Ausnahme von GDL eingewogen und im Glycerol suspendiert. Durch Zugabe von Wasser wurden die löslichen Bestandteile

unter Rühren gelöst und zuletzt das Gluconolacton zugegeben. Die fertige Suspension wurde in eine Teflonform gegossen und 24 h lang bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Erosion der ausgestanzten Augeninserte mit einem Durchmesser von 5 mm wurde wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben untersucht. Zusätzlich wurden die Inserte nach dem Waschen mit Wasser noch fotografiert.

Bestandteil	Menge
Alginate	2%
Glycerol	5%
CaHPO ₄	0,2%
GDL*	0,4%
H ₄ -EDTA	0,34%
ddH ₂ O	92,06%

Tab. 6: Zusammensetzung der Alginatlösung zur Herstellung von H₄-EDTA-enhaltenden Augeninserten.

* GDL wurde als letzte Substanz zugegeben

2.3.4 Löslichkeit der mit CaCl₂/Na₂-EDTA quervernetzten Augeninserte

Die in Abschnitt 2.1.2 beschriebene Methode zur Herstellung von CaCl₂/Na₂-EDTA-enhaltenden Augeninserte wurde hier leicht verändert. Glucono- δ -lacton wurde nicht als Feststoff zur Alginatlösung gegeben, sondern in 1 ml Wasser gelöst und dann in einer Spritze mit 3 ml der sterilfiltrierten Alginatlösung gemischt. Diese war deswegen um einen Faktor $\frac{4}{3}$ höher konzentriert (Zusammensetzung s. Tab. 7). Die fertige Mischung wurde komplett in eine Teflonform gegeben und 48 h lang bei Raumtemperatur quervernetzt und getrocknet.

Bestandteil	Konzentration (%)
Alginate	2,67
Glycerol	1,33
CaCl ₂	2,67
Na ₂ -EDTA	6,93
Wasser	86,4

Tab. 7: Zusammensetzung der konzentrierteren Alginatlösung.

In einem ersten Versuch wurde die Quervernetzung der Alginatlösung wie gewohnt durch Zugabe von 1% GDL aufgelöst. Die Auflösung der aus der resultierenden Matrix aus-

gestanzten Inserte wurde ebenfalls im Trispuffer bei 37°C untersucht, jedoch wurde hier die gelöste Menge Alginat direkt mit dem in Abschnitt 2.3.5 beschriebenen Alginatnachweis quantifiziert. Dazu wurden zu vorher festgelegten Zeitpunkten 1 ml-Proben gezogen und das entnommene Volumen durch frischen Trispuffer ergänzt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die verwendete GDL-Konzentration die in vitro-Auflösungsgeschwindigkeit der Augeninserte beeinflusst. Dazu wurden verschiedene Mengen GDL in Wasser gelöst und mit der konzentrierteren Alginatlösung (Tab. 7) gemischt. Die endgültige Zusammensetzung der vier Lösungen, wie sie zur Quervernetzung in die Teflonformen gegossen wurden, ist in Tab. 8 angegeben. Auch hier wurde das gelöste Alginat quantifiziert.

Bestandteil	Konzentration (%)			
	I	II	III	IV
Alginat		2		
Glycerol		1		
CaCl ₂		2		
Na ₂ -EDTA		5,2		
GDL	0,6	0,8	1,0	1,5
Wasser	89,2	89	88,8	88,3

Tab. 8: Zusammensetzung der in die Teflonform gegebenen, GDL-enthaltenden Lösungen (Versuche I-IV enthalten nur unterschiedliche GDL-Konzentrationen).

2.3.5 Borat-Carbazol-Nachweis für gelöstes Alginat

Der Nachweis für gelöstes Alginat erfolgte nach der von May und Chakrabarty beschriebenen Methode [98]. Dazu wurde zunächst eine 4M Boratstammlösung der in Tab. 9 angegebenen Zusammensetzung hergestellt. Diese Stammlösung kann zur Auflösung von während der Lagerung auskristallisierten Substanzen erwärmt werden. Unmittelbar vor jeder Messung wurde daraus eine 0,1M Boratarbeitslösung hergestellt, indem 1,25 ml der Stammlösung mit konzentrierter Schwefelsäure zu 50,0 ml verdünnt wurden. Diese wurde in Eiswasser gekühlt, um dann jeweils 600 µl davon in vorbereitete Eppendorf-Reaktionsgefäße zu geben. Anschließend wurde die Boratarbeitslösung in den Reaktionsgefäßen vorsichtig mit 70 µl Probe überschichtet und weiter im Eiswasser gekühlt. Diese Mischungen wurden nacheinander 4 s lang auf dem Vortex-Mischer gemischt und danach sofort wieder im Eiswasser gekühlt. Diese Mischung wurde dann mit 20 µl einer frisch hergestellten Carbazollösung (10% (m/V) in absolutem Ethanol) überschichtet und erneut 4 s lang gemischt. Während des Mischens einer

Probe wurden die anderen weiter im Eiswasser gekühlt. Zuletzt wurden alle Proben gemeinsam im Wasserbad 30 min lang auf 55°C erhitzt, damit sich die Farbe entwickeln konnte. Nachdem die Proben wieder auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden jeweils 200 µl davon in 96-Well Platten pipettiert und die Absorption bei 530 nm gemessen (Shimadzu Plattenscanner CS-9301PC). Die Färbung bleibt bei Raumtemperatur zwei Stunden lang stabil.

Bestandteil	Menge
Borsäure	24,74 g
KOH-Lsg. (4M)	45,0 ml
ddH ₂ O	ad 100,0 ml

Tab. 9: Zusammensetzung der Borat-Stammlösung für den Alginatnachweis.

2.4 Beladung der Inserte mit EGF

2.4.1 MALDI-ToF Analyse von EGF

Die Massenspektroskopische Untersuchung der beiden EGF-Sorten erfolgte an einem GSG future MALDI-ToF MS System (Firma GSG Mess- und Analysengeräte). Als Matrix diente α -Cyano-4-hydroxymizinsäure, die in einer Konzentration von 10 mg/ml (das entspricht etwa 52 mM) in einem Gemisch aus 70% Acetonitril und 30% Wasser gelöst wurde. Die EGF-Lösung wurde mit bidestillierten Wasser auf 50 μ g/ml verdünnt (das entspricht etwa 8 μ M) und dann 1 μ l davon mit 1 μ l der Matrixlösung gemischt. In der Literatur wird ein etwa 1000 bis 10000facher molarer Überschuss der Matrix gefordert [91]; in der hier verwendeten Mischung lag die Matrix in 6500facher molarer Menge vor. Von dieser EGF-Matrix-Lösung wurde 1 μ l auf den Probenhalter aufgetragen und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Zur Aufnahme der Massenspektren im Bereich von 2000-8000 m/z wurden mindestens 100 Einzelmessungen addiert.

Die Aufnahme der Massenspektren für die Identifizierung der Abbauprodukte erfolgte an einem Proteomics Analyzer 4700 (Firma Applied Biosystems) mit höherer Auflösung. Auch hier wurde α -Cyano-4-hydroxymizinsäure als Matrix verwendet.

2.4.2 LC/MS-Analyse

Zur LC/MS-Analyse der beiden EGF-Sorten wurden jeweils 10 μ l der beiden Lösungen in eine analytische HPLC-Anlage injiziert. Diese Anlage bestand aus einer Pumpe (HP1100 Binary Pump), einem Autoinjektor (HP1100 AutoSampler), einem Säulenofen (HP1100 Heater) und einem Diodenarray-Detektor (HP1100 DAD, alle Firma Agilent) und war an ein ESI-Massenspektrometer (TSQ, Firma Thermoquest) gekoppelt. Die chromatographische Auftrennung der Peptide in den Lösungen erfolgte mit den in Tab. 10 angegebenen Bedingungen. Zusätzlich zum UV-Signal des Diodenarray-Detektors wurde jeweils ein Totalionen-Chromatogramm aufgenommen.

Fließmittel	A: 900 ml ddH ₂ O 100 ml Acetonitril 1 ml TFA	B: 900 ml Acetonitril 100 ml ddH ₂ O 1 ml TFA
Gradient	0 min: 5% B in A 5 min: 5% B in A 25 min: 30% B in A 35 min: 30% B in A 40 min: 5% B in A 45 min: Ende	
Flussrate	0,28 ml/min	
Säule	Phenomenex Jupiter 300 (C18) bei 40°C	
UV-Detektion	220 nm	

Tab. 10: Parameter zur chromatographischen Trennung der EGF-Sorten während der LC/MS-Analyse.

2.4.3 Stabilität von EGF während der Herstellung von Augeninserten

Die EGF-Stabilität wurde zum einen in Abhängigkeit von der zur Quervernetzung der Matrix verwendeten Methode untersucht, zum anderen in Abhängigkeit vom vor der Quervernetzung eingestellten pH-Wert.

Um den Einfluss der Quervernetzungsmethode zu prüfen, wurden Alginatmatrices nach der in den Abschnitten 2.1.1 (äußere Gelierung) und 2.1.2 (innere Gelierung mit CaHPO₄/GDL) beschriebenen Methode in Teflonschalen hergestellt. Dabei wurde EGF dem jeweiligen Ansatz erst zugegeben, wenn das Alginat komplett gelöst war. Die Zusammensetzung der Ansätze ist in Tab. 11 angegeben.

Bestandteil	Äußere Gelierung	Innere Gelierung
Alginat	2%	2%
Glycerol	5%	5%
CaHPO ₄	–	0,2%
GDL	–	0,4%
ddH ₂ O	93%	92,4%
EGF	64 µg	64 µg

Tab. 11: Zusammensetzung der Lösungen, aus denen die Alginatmatrices für die Stabilitätsuntersuchungen von EGF hergestellt wurden.

Die Abhängigkeit der EGF-Stabilität vom eingestellten pH-Wert wurde anhand der $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Methode untersucht. Dazu wurden drei Ansätze wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben hergestellt, wobei der pH-Wert der verwendeten $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Lösung entweder auf 7, 9 oder 11 eingestellt wurde. Die Zugabe von EGF erfolgte hier zusammen mit GDL als Lösung. Tab. 12 zeigt die Zusammensetzung der Lösungen, wie sie in die Teflonschalen gegossen wurden.

Bestandteil	Konzentration
Alginat	1%
Glycerol	1%
CaCl_2	1%
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	2,6%
GDL	1%
EGF	100 μg
ddH ₂ O	93,4%

Tab. 12: Zusammensetzung der Lösung, aus der die Alginatmatrices zur Stabilitätsuntersuchung von EGF hergestellt wurden. Diese Lösung wurde mit drei verschiedenen pH-Werten (7, 9 und 11) hergestellt.

Die trockenen Alginatmatrices wurden in 15 ml Trispuffer (pH 7,4), der zusätzlich 5% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ enthielt, aufgelöst. Aus diesen Lösungen wurde das Alginat mittels einer Festphasenextraktion entfernt (s. Abschnitt 2.4.4); gleichzeitig erfolgte in diesem Schritt eine Aufkonzentrierung der Lösungen. Die Analyse der Abbauprodukte erfolgte mit der in Abschnitt 2.4.5 beschriebenen HPLC-Methode.

2.4.4 Festphasenextraktion

Zur Analyse der EGF-Abbauprodukte musste das Alginat abgetrennt werden, da dieses in dem verwendeten HPLC-Fließmittel nicht löslich ist. Die Abtrennung erfolgte mittels einer Festphasenextraktion, bei der EGF an das Sorbens (Strata C18-E, Firma Phenomenex) adsorbierte, während Alginat nicht mit der Festphase interagierte und deswegen mit dem Puffer abgesaugt wurde. Zunächst wurde das Sorbens mit 0,5 ml Methanol konditioniert und mit 0,5 ml äquilibriert. Danach wurde die Probe wegen des begrenzten Volumens der Kartusche in 15 Portionen von je 1 ml aufgegeben. Anschließend wurde die Festphase durch Absaugen des Puffers (Wasserstrahlpumpe) fünf Minuten lang getrocknet. Die Elution der Peptide erfolgte mit 0,5 ml 50%igem Methanol, das während der ersten zwei Minuten

langsam das Sorbens durchdringen konnte, bevor die Wasserstrahlpumpe angeschaltet wurde. Sämtliche Schritte der Festphasenextraktion liefen bei einer Fließgeschwindigkeit von etwa 1 ml/min ab, die durch die Wasserstrahlpumpe reguliert werden konnte.

2.4.5 HPLC-Methode

Die HPLC-Analyse erfolgte auf einer Shimadzu LC10AT HPLC-Anlage, bestehend aus einer Zweikolbenpumpe mit Gradientenmischer, einem Autoinjektor, einem Säulenofen, einem UV-Detektor und einem Fluoreszenz-Detektor (alle Firma Shimadzu).

Zur Analyse der Abbauprodukte wurden 20 µl der jeweiligen EGF-Lösung injiziert und mit den in Tab. 13 angegebenen Parametern analysiert. Zum Sammeln der einzelnen Fraktionen wurden 100 µl injiziert, um möglichst viel Substanz für die MALDI-ToF Untersuchung zu erhalten. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-Software Class VP (Version 6.12) von Shimadzu aufgezeichnet und ausgewertet.

Fließmittel	A: 900 ml ddH ₂ O 100 ml Acetonitril 1 ml TFA	B: 900 ml Acetonitril 100 ml ddH ₂ O 1 ml TFA
Gradient	0 min: 5% B in A 2 min: 5% B in A 5 min: 15% B in A 35 min: 30% B in A 40 min: 5% B in A 50 min: Ende	
Flussrate	1 ml/min	
Säule	Phenomenex Jupiter 300 (C18) bei 40°C	
UV-Detektion	210 nm und 280 nm	
Fluoreszenz-Detektion	$\lambda_{\text{ex.}} = 270 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em.}} = 310 \text{ nm}$	

Tab. 13: Parameter zur chromatographischen Trennung der EGF-Abbauprodukte.

2.4.6 Freisetzungsuntersuchungen

Die Augeninserte für die Freisetzungsuntersuchungen wurden nach der CaCl₂/Na₂-EDTA-Methode in Teflonformen hergestellt. Abweichend von der in Abschnitt 2.1.2 beschriebenen Methode wurde hier zunächst eine AlginateLösung hergestellt und sterilfiltriert, von der dann 3 ml mit einer EGF-GDL-Lösung (1 ml) gemischt und in eine Teflonform von 4 cm Durchmesser gegeben wurde. Nach 48 h wurden aus der getrockneten Matrix Inserte von 5 mm

Durchmesser ausgestanzt. Für die Herstellung der Lösungen wurden sowohl die niedrigviskosen Alginat (LF10/60 und LF10/60LS) als auch das hochviskose LF200S in ein- und zweiprozentiger Konzentration verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Lösungen ist in Tab. 14 angegeben.

Bestandteil	1%ige Lösung	2%ige Lösung
Alginat	1%	2%
Glycerol	1%	1%
CaCl ₂	1%	2%
Na ₂ -EDTA	2,6%	5,2%
GDL	1%	1%
EGF	0,8 mg [*]	0,8 mg [*]
ddH ₂ O	93,4%	88,8%

Tab. 14: Zusammensetzung der Alginatlösungen, aus denen die Augeninserte für die Freisetzungsuntersuchungen hergestellt wurden.

* 0,8 mg EGF entsprechen 1 ml der kubanischen EGF-Lösung

Die **Inkubation der Inserte** erfolgte in 20 ml-Schnappdeckelgläsern in einem Schüttelwasserbad (Typ 1086, Firma GFL) bei 37°C in 5 ml Trispuffer. Zu vorher festgelegten Zeiten wurden Proben von 1 ml gezogen und bis zu ihrer Analyse bei -80°C eingefroren. Das entnommene Volumen wurde sofort durch frischen Puffer ergänzt. Die Quantifizierung von EGF erfolgte durch eine HPLC-Analyse mit den in Tab. 15 angegebenen Bedingungen gegen eine Kalibriergerade. Die Bestimmung der Freisetzung erfolgte dreifach, aufgetragen gegen die Zeit wurde der Durchschnitt aus den drei Proben mit der Standardabweichung.

Die Freisetzungsuntersuchungen wurden auch in einer **Mikrodurchflusszelle** mit einem Volumen von nur 72 µl durchgeführt. Dazu wurde zunächst das gesamte System mit frischem Puffer gespült. Anschließend wurde jeweils ein Insert in die Kammer gelegt und diese mit Puffer gefüllt. Erst danach wurde das System geschlossen und die Freisetzung mit einem Fluss von 5 µl pro Minute gestartet. Die Freisetzung erfolgte bei 37°C, die Proben wurden bei 4°C in einem Fraktionensammler jeweils 30 min lang gesammelt. Bis zur HPLC-Analyse (s. Tab. 15) wurden die Proben bei -80°C eingefroren. Auch mit diesem System wurde die Freisetzung dreifach bestimmt.

Fließmittel	<div>A: 900 ml ddH₂O 100 ml Acetonitril 1 ml TFA</div> <div>B: 900 ml Acetonitril 100 ml ddH₂O 1 ml TFA</div>
Gradient	0 min: 5% B in A 2 min: 5% B in A 17 min: 30% B in A 27 min: 30% B in A 30 min: 5% B in A 40 min: Ende
Flussrate	1 ml/min
Injektionsvolumen	100 µl
Säule	Phenomenex Jupiter 300 (C18) bei 40°C
UV-Detektion	210 nm und 280 nm
Fluoreszenz-Detektion	$\lambda_{\text{ex.}} = 270 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em.}} = 310 \text{ nm}$

Tab. 15: Parameter zur chromatographischen Trennung von EGF nach den Freisetzungsuntersuchungen.

2.5 Drug Delivery System zur intraokulären Anwendung

2.5.1 Ausfällung von Proteinen mit Polyethylenglykolen

Zur Beladung des in situ gelierenden PEG-Hydrogels mit Bevacizumab (Avastin[®]) wurde der Antikörper ausgefällt, damit er nicht mit der aminreaktiven Vorstufe des PEG-Hydrogels reagiert. Plasmaproteine, zu denen auch die Antikörper zählen, können durch Zugabe von löslichen Polyethylenglykolen (PEGs) präzipitiert werden, ohne dass ihre biologische Aktivität beeinträchtigt wird [49]. Daher wurde den in situ gelierenden PEG-Hydrogelen, zusätzlich zu seinen quervernetzbaaren Komponenten PEG-Amin und PEG-Succinimidylpropionat, noch unverändertes PEG zugesetzt. Um die für eine vollständige Präzipitation benötigte Menge PEG zu bestimmen, wurden zunächst Versuche mit der γ -Globulinfraktion aus bovinem Blut als Modellproteine durchgeführt.

Dazu wurden 75 μ l einer gepufferten Lösung der bovinen γ -Globuline (10 mg/ml, in Phosphatpuffer pH 7,0) zu 675 μ l der jeweiligen PEG-Lösung gegeben (Endkonzentration 1 mg/ml). Diese wurden gemischt und anschließend 30 min bei 16100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm vermessen. Verwendet wurden Polyethylenglykole unterschiedlicher Kettenlänge (PEG 400, PEG 2000 und PEG 10000) in Konzentrationen von 10% bis 50%. Die Messungen erfolgten dreifach und wurden um den Blindwert korrigiert (75 μ l reiner Puffer anstelle der Proteinlösung). Als Kontrolle diente eine Probe ohne PEG, in der sämtliches Protein gelöst blieb.

2.5.2 Rheologie

Die Untersuchungen zur Gelbildung der in situ gelierenden PEG-Hydrogele in Gegenwart von zusätzlichem, nicht-quervernetzbaarem PEG erfolgten am oszillierenden Rheometer. Die Proben wurden mit einer Doppelkammerspritze aufgegeben (630 μ l), als Messgeometrie diente eine Stahlplatte von 40 mm Durchmesser mit einem Probenspalt von 500 μ m. Die Messung erfolgte unter kontinuierlicher Oszillation bei 37°C über einen Zeitraum von 90 min mit einer Oszillationsfrequenz von 0,5 Hz und einem Drehmoment von 10 μ Nm. Während der Messung wurde alle 20 s ein Wert aufgezeichnet. Um die Verdunstung von Wasser aus dem Probenspalt zu minimieren, wurde die Geometrie mit einer Lösungsmittelfalle bedeckt. Vor der eigentlichen Messung erfolgte ein Konditionierungsschritt von 2 min Dauer, damit die Probe die Temperatur von 37°C annehmen konnte. Aufgezeichnet wurden das Speichermodul G' , das Verlustmodul G'' und die Phasenverschiebung δ .

Die Untersuchung der Gelstärke in Gegenwart von Avastin[®] (Bevacizumab) erfolgte mit den gleichen Einstellungen, jedoch wurde hier der Betrag des komplexen Moduls $|G^*|$ als Maß für die Gelstärke aufgezeichnet.

2.5.3 Freisetzungen

Insgesamt wurden drei Freisetzungsuntersuchungen mit den PEG-Hydrogelen durchgeführt, zwei mit fluoreszenzmarkiertem Immunglobulin G (FITC-IgG) als Modellprotein und eine mit dem Wirkstoff Bevacizumab (Avastin[®]). Im ersten Versuch wurde der Einfluss der Kettenlänge des zur Ausfällung des Proteins benutzten löslichen PEGs untersucht, im zweiten dessen Konzentration und im dritten wurde ein Einfluss der Konzentration der quervernetzbaaren Gelbestandteile (PEG-Amin und PEG-Succinimidyl-Propionat) untersucht. Die Herstellung der Gele erfolgte in silanisierten Glasringen, die zur Abdichtung in erstarrtes Wachs gedrückt wurden. Die Zusammensetzung der Gele für die einzelnen Freisetzungsversuche ist in Tab. 16, Tab. 17 und Tab. 18 angegeben. Die beiden Gelbestandteile wurden jeweils getrennt voneinander gelöst, PEG-Succinimidyl-Propionat in Wasser (bzw. in der wässrigen PEG-Lösung), das PEG-Amin in Phosphatpuffer pH 7,0 (bzw. in der gepufferten PEG-Lösung). Das Protein wurde immer zur PEG-Amin-Lösung gegeben. Die beiden Lösungen wurden getrennt in eine Doppelkammerspritze aufgezogen, aus der jeweils 125 μ l der beiden Lösungen gleichzeitig durch eine Kanüle in einen Glasring eingefüllt wurden; die Durchmischung der beiden Lösungen erfolgte in der Kanüle. Diese Lösungen (250 μ l) wurden anschließend zur Gelierung eine Stunde lang im Trockenschrank aufbewahrt.

Polymergehalt	FITC-IgG	PEG 400	PEG 2000
4%	100 μ g	–	–
4%	100 μ g	50%	–
4%	100 μ g	–	30%

Tab. 16: Zusammensetzung der PEG-Hydrogele im ersten Freisetzungsversuch.

Polymergehalt	FITC-IgG	PEG 2000
4%	100 µg	–
4%	100 µg	10%
4%	100 µg	20%
4%	100 µg	30%

Tab. 17: Zusammensetzung der PEG-Hydrogele im zweiten Freisetzungsversuch.

Polymergehalt	Bevacizumab (Avastin [®])	PEG 2000	PEG 10000
4%	1,25 mg	–	–
4%	1,25 mg	30%	–
4%	1,25 mg	–	10%
10%	1,25 mg	–	–
10%	1,25 mg	30%	–
10%	1,25 mg	–	10%

Tab. 18: Zusammensetzung der PEG-Hydrogele im dritten Freisetzungsversuch.

Zur Freisetzung wurden die fertigen Gele aus den Glasringen gelöst, quantitativ in jeweils ein silanisiertes Freisetzungsgefäß gegeben und gewogen. Die Freisetzung erfolgte in 5 ml Phosphatpuffer pH 7,4 bei 37°C. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde jeweils eine Probe von 500 µl gezogen und das entnommene Volumen mit frischem Puffer ergänzt. Zur Vermessung der Proben wurden jeweils 200 µl in eine 96-Wellplatte überführt und deren Fluoreszenz bestimmt (FITC-IgG: $\lambda_{\text{ex.}}$ 490 nm, $\lambda_{\text{em.}}$ 520 nm; Bevacizumab: $\lambda_{\text{ex.}}$ 280 nm, $\lambda_{\text{em.}}$ 335 nm).

Kapitel 3

Herstellung von Augeninserten auf Alginatbasis

1. Einleitung

Alginat sind natürlich vorkommende Polysaccharide, die vorwiegend aus verschiedenen marinen Braunalgenarten gewonnen werden. Den Algen dient Alginat als strukturgebendes Element, das im interzellulären Raum ein Gel ausbildet. Diese Gelmatrix ist in den verschiedenen Pflanzenorganen unterschiedlich zusammengesetzt und verleiht zum Beispiel den Stängeln ihre mechanische Steifigkeit sowie den Blättern die nötige Flexibilität, um sich mit dem Wasser bewegen zu können [106].

Chemisch sind Alginat aus zwei Monomeren aufgebaut, den Salzen der α -L-Guluronsäure und der β -D-Mannuronsäure (s. Abb. 9a), im Folgenden mit „G“ bzw. „M“ abgekürzt. Diese sind nicht homogen im Polymer verteilt, sondern bilden entlang der Polysaccharidkette einzelne Blöcke, die entweder nur aus Guluronsäure (G-Blöcke) bzw. Mannuronsäure (M-Blöcke) oder aus beiden Monomeren in alternierender Reihenfolge (G/M-Blöcke) bestehen. Guluronsäure liegt immer in der 1C_4 -Konformation, Mannuronsäure ausschließlich in der 4C_1 -Konformation vor. Die (1 \rightarrow 4)-glykosidische Bindung zwischen den Monomeren ist daher in den M-Blöcken immer äquatorial ausgerichtet, während in den G-Blöcken die Monomere immer axial verbunden sind (s. Abb. 9b) [30].

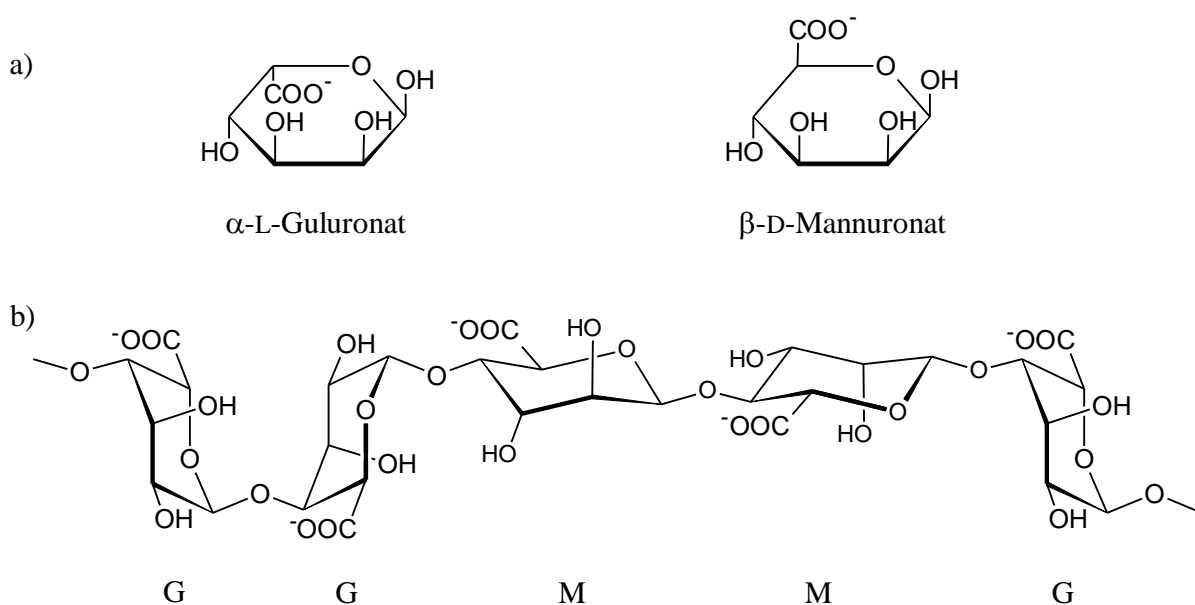


Abb. 9: Struktur von Alginaten (nach [30]).

a) Monomere b) Konformation der Polysaccharidkette

Die Quervernetzung von Alginaten beruht auf diesen axial verbundenen G-Blöcken. Bei dem Vorgang werden mehrwertige Kationen, wie zum Beispiel Ca^{2+} , von den Polysaccharidketten gebunden. Dafür sind die G-Blöcke verantwortlich, da nur diese aufgrund ihrer speziellen

Konformation in der Lage sind, die Kationen zu chelatisieren. Dabei bildet sich eine Struktur, an der mehrere Polysaccharidketten beteiligt sind und die in der Literatur als „egg box“ bezeichnet wird [42]. Die G-Blöcke bilden eine Art Tasche, in der das Kation durch die Elektronenpaare der zahlreichen Sauerstoffreste fixiert wird (s. Abb. 10). Die Quervernetzung läuft unter milden Bedingungen bei Raumtemperatur ab, sobald freie Ca^{2+} -Ionen mit einer Alginatlösung in Berührung kommen. Daher eignet sich Alginat hervorragend als Matrixbildner für empfindliche Stoffe (wie zum Beispiel Proteine und Enzyme) und sogar für die Einbettung von lebenden Zellen [127].

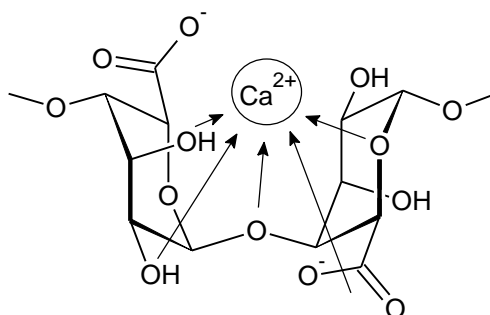


Abb. 10: Ca^{2+} -Bindungsstelle in einem G-Block (nach [30]).

Die oben beschriebene Quervernetzung erfolgt umgehend bei Kontakt von freien Ca^{2+} -Ionen mit gelöstem Alginat. Um homogene Gele zu erhalten, muss das Kation der Lösung also in kontrollierter Weise zugeführt werden, wozu zwei verschiedene Möglichkeiten in Betracht kommen. Die einfachere Gelbildung durch Diffusion (oder äußere Gelierung) von Kationen aus einer die Alginatlösung umgebenden Lösung wird vor allem zur Herstellung von Mikropartikeln verwendet [126]. Bei der sogenannten inneren Gelierung wird dagegen ein schwerlösliches Calciumsalz in der Alginatlösung suspendiert und anschließend durch eine graduelle pH-Wert-Verringerung dessen Löslichkeit gesteigert. Die bei der Auflösung freiwerdenden Kationen können dann die Alginatketten von innen heraus quervernetzen und es entsteht ein homogenes Gel [74].

In diesem Kapitel werden Versuche zur Herstellung von Augeninserten auf Alginatbasis beschrieben. Ziel war es, eine möglichst einfache und reproduzierbare Methode zur Herstellung der Alginatmatrix zu finden. Diese erfolgte entweder durch das Ausstreichen einer Alginatlösung zu Filmen definierter Schichtdicke oder durch Ausgießen eines bestimmten Volumens in eine runde Teflonform. Außerdem wurde geprüft, ob und wie die beiden oben beschriebenen Möglichkeiten der Quervernetzung zur Insertherstellung verwendet werden können. In weiteren Versuchen wurde der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen des Weichmachers Glycerol auf die mechanischen Eigenschaften der quervernetzten Alginat-

matrix untersucht. Da Arzneimittel zur Anwendung am Auge steril sein müssen, wurde mit Hilfe eines Rotationsviskosimeters der Einfluss von zwei Sterilisationsmethoden auf die Alginatmatrix untersucht.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Herstellungsmethoden

Die Augeninserte werden aus einem trockenen, quervernetzten Alginatfilm ausgestanzt. Um diesen in definierter Schichtdicke herzustellen, wurde zunächst die Alginatlösung zu Filmen von 1000 μm Dicke gezogen, die dann an der Luft getrocknet wurden. Wie Abb. 11 am Beispiel eines langkettigen Alginats mit hoher Viskosität zeigt, ist der Film wegen der gering konzentrierten Alginatlösung (4%) nach dem Trocknen allerdings nur noch etwa 20 μm dick. Die Abbildung zeigt auch, dass durch das Auftragen von mehreren Schichten die Filmdicke erhöht werden kann, so dass nach vier Schichten ein gut zu handhabender Film von etwa 100 μm Dicke entsteht. Es wurde auch versucht, die Konzentration des Alginats zu verdoppeln, allerdings ist eine 8%ige Lösung des hochviskosen Alginats LF200S bei Raumtemperatur nicht mehr fließfähig. Von den niedrigviskosen Alginaten dagegen konnte eine 8%ige Lösung hergestellt werden, allerdings mussten auch dann noch zwei Schichten übereinander gezogen werden, um ausreichend dicke Filme herzustellen.

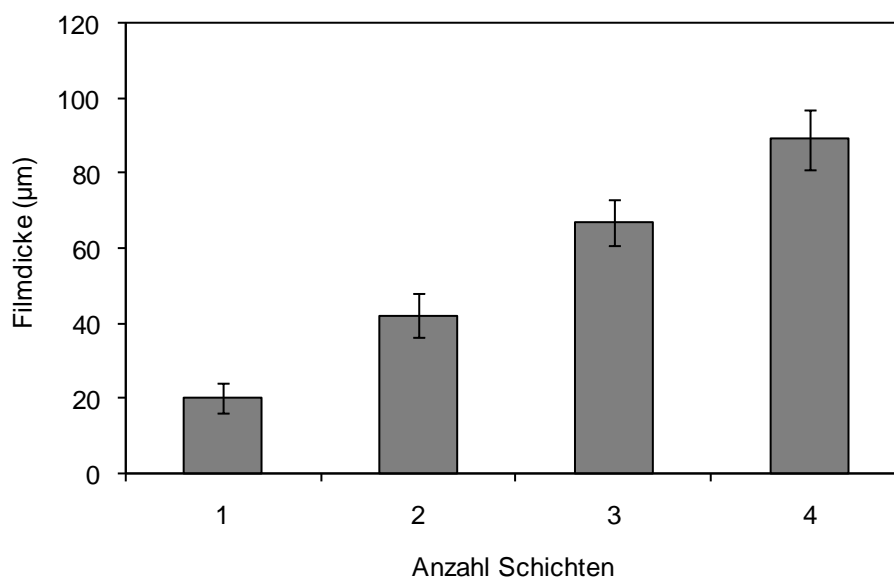


Abb. 11: Dicke von getrockneten Alginatfilmen, die durch (mehrmaliges) Ausziehen einer 4%igen Lösung (LF200S, hochviskos) auf Glas hergestellt wurden.

Die Filmziehmethode ist also sehr zeitaufwändig, da jede Schicht zuerst trocknen muss, bevor die nächste aufgetragen werden kann. Außerdem zerfließen die aufgetragenen Lösungen sehr leicht, weil sie ohne seitliche Begrenzung auf eine Glasplatte gezogen werden. Um das zu vermeiden, sollte die verwendete Lösung nicht in zu dicker Schicht ausgestrichen werden und möglichst hochviskos sein. Die notwendige Viskosität ist gleichzeitig ein weiterer Nachteil der Filmziehmethode, da Alginatlösungen nur durch Filtration sterilisiert werden können, ohne ihre Eigenschaften zu verändern (siehe Abschnitt 2.3). Die hier verwendeten Alginatlösungen waren trotz der niedrigen Konzentration schon zu viskos und konnten nicht sterilfiltriert werden. Dazu sollten die Lösungen höchstens 1% des hochviskosen Alginats (LF200S) bzw. 2% der niedrigviskosen Alginat (LF10/60 und LF10/60LS) enthalten.

Eine Möglichkeit zur Verarbeitung solcher Alginatlösungen mit niedriger Viskosität sind einfache Teflonformen, in die ein bestimmtes Flüssigkeitsvolumen eingefüllt wird. Die Schichtdicke lässt sich dann einfach durch die eingefüllte Menge variieren. Werden 3,8 ml einer 1%igen Alginatlösung (LF10/60), welche gut durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße filtrierbar ist, in eine Teflonform mit 4 cm Durchmesser gegeben, so beträgt die Füllhöhe in der Form etwa 3 mm. Die daraus entstehenden Filme sind nach der Trocknung dann noch etwa 120 µm dick.

Der nächste Schritt bei der Insertherstellung aus Natriumalginat ist die Quervernetzung der Matrix mit Ca^{2+} -Ionen. Wie schon in Abschnitt 1 beschrieben, gibt es dazu grundsätzlich zwei verschiedene Methoden, die äußere und die innere Gelierung. Bei der äußeren Gelierung wird der getrocknete Alginatfilm zur Quervernetzung eine Minute lang in eine CaCl_2 -Lösung eingetaucht und muss anschließend nochmals getrocknet werden [70]. Da der Film dann nicht mehr auf einer Unterlage fixiert ist, kann er sich während der Trocknung leicht auf wellen, so dass die daraus ausgestanzten Inserte eher unregelmäßig geformt sind (s. Abb. 12, links). Im Unterschied dazu erfolgt die Quervernetzung bei der inneren Gelierung während des Trocknungsprozesses, der Film bleibt also immer an der Unterlage fixiert und kann sich nicht auf wellen (vgl. Abb. 12, rechte Seite). Auf dem Bild erkennt man aber auch gut die beim Ausstanzen der Inserte entstandenen Risse, die zeigen, wie spröde der getrocknete Film ist. Diese fehlen zwar bei den Inserten auf dem linken Photo, jedoch erkennt man hier gut die fehlende Flexibilität der Augeninserte. Das Problem der Sprödigkeit kann durch früheres Ausstanzen aus dem noch feuchten Film leicht umgangen werden. Die fehlende Flexibilität kann allerdings leicht zu Problemen bei der Anwendung führen, da ein starres Insert kurz nach dem Einlegen in den Bindehautsack ein starkes Fremdkörpergefühl im Auge auslöst, das erst

wieder nachlässt, wenn das Insert durch die Tränenflüssigkeit genügend befeuchtet wurde [36].

Quervernetzt durch äußere Gelierung



Quervernetzt durch innere Gelierung



Abb. 12: Fertig getrocknete Augeninserte, deren Matrix durch verschiedene Methoden quervernetzt wurde.

2.2 Einfluss von Glycerol auf die Alginatfilme

Die Flexibilität der Inserte wird durch deren Quellung in Wasser erheblich verbessert. Damit die Inserte auch in getrocknetem Zustand flexibel bleiben, sollte die Alginatmatrix also nicht komplett austrocknen. Daher wurde versucht, die Flexibilität durch den Zusatz von Glycerol als Feuchthaltemittel zu steigern. Gleichzeitig dient Glycerol selbst auch als Weichmacher [6] und kann daher auch direkt die Flexibilität der Augeninserte verbessern.

Schon die geringste Konzentration von 1% Glycerol in der Alginatlösung beeinflusste die Eigenschaften des getrockneten Films deutlich. Dieser war, wie auch bei den höheren Konzentrationen (bis 5%) merklich weicher und biegsamer als ein Film ohne Glycerol. Bei der Messung der Filmdicke zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme bis zu einem Glycerolgehalt der Alginatlösung von 3%. Die Dicke der Filme stieg von etwa 90 μm ohne Glycerol auf einen Wert von ca. 120 μm , der auch bei höheren Glycerol-Konzentrationen als 3% nicht mehr weiter anstieg (s. Abb. 13).

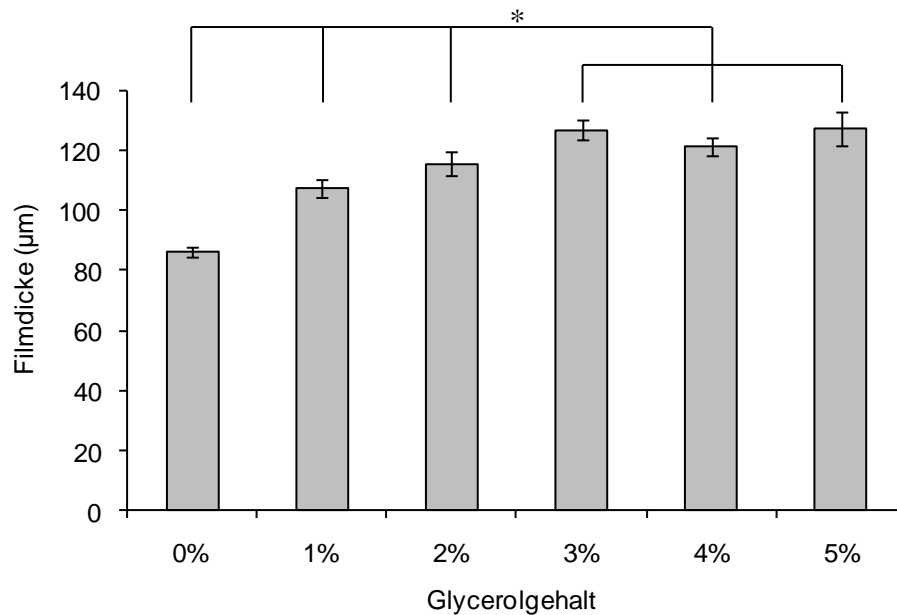


Abb. 13: Dicke der getrockneten Alginatfilme in Abhängigkeit vom Glycerolgehalt der Alginatlösung ($p < 0,01$).

Die Änderung der Schichtdicke wird wahrscheinlich nicht allein durch den Zusatz von Glycerol bedingt, weil dann kein Grenzwert zu beobachten wäre. Vielmehr ist für die Dickenänderung wohl das in den Filmen zurückgehaltene Wasser verantwortlich, weshalb auch die Restfeuchte der Filme bestimmt wurde. Wie Abb. 14 zeigt, war hier allerdings kein konzentrationsabhängiger Einfluss des Glycerolgehalts zu erkennen. Vielmehr schwankte die Restfeuchte der Filme mit Weichmacher um einen Wert von ca. 16% und lag damit deutlich über dem Wert des Glycerol-freien Filmes, der nur ungefähr 11% Wasser enthielt. Obwohl die Filme im Ofen nur auf 80°C erhitzt wurden, zeigten sie im Laufe der Zeit eine Braunfärbung. Diese könnte auf eine Dehydratation der Kohlenhydrat-Monomere des Alginats deuten [114], welche eine korrekte Bestimmung der Restfeuchte durch ein thermisches Verfahren erschwert, da nicht zwischen der tatsächlichen Restfeuchte und durch Dehydratation gebildetem Wasser unterschieden werden kann.

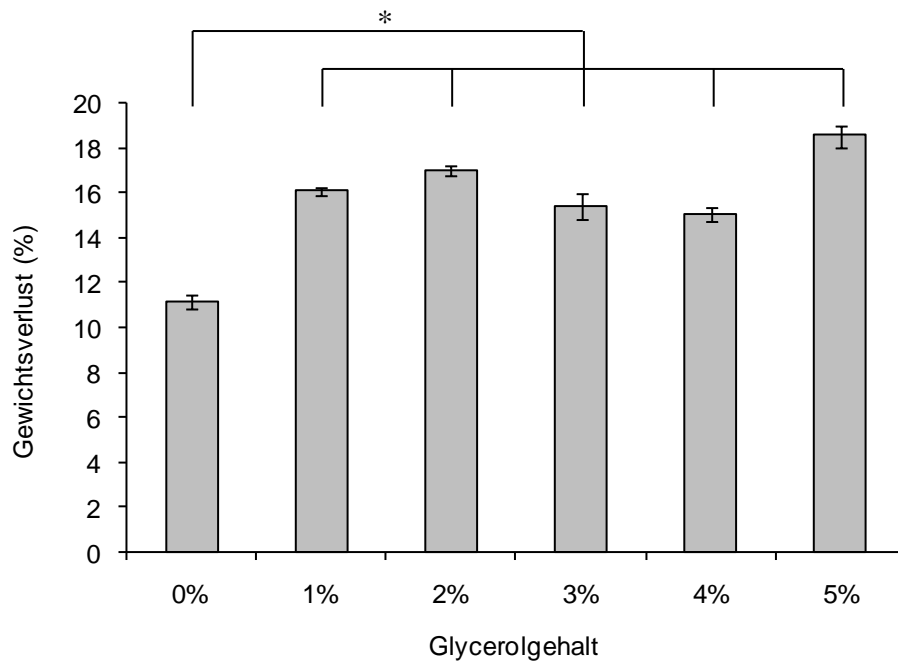


Abb. 14: Gewichtsverlust der Alginatfilme nach 48 h Lagerung bei 80°C als Maß für die Restfeuchte ($p < 0,01$).

Schichtdicke und Restfeuchte werden zwar durch den Weichmacher beeinflusst, aber sie lassen keinen Rückschluss auf die Flexibilität der Alginatfilme zu. Um die organoleptisch festgestellte erhöhte Flexibilität der Glycerol-haltigen Filme auch messen zu können, muss eine mechanische Analyse durchgeführt werden. Deswegen wurde ein Zugversuch durchgeführt, bei dem eine Probe langsam gedehnt wird und die dazu benötigte Kraft gemessen wird. Aus der Kraft und der Querschnittsfläche der Probe wird dann die Zugspannung berechnet und in ein Spannungs-Dehnungs-Diagramm eingetragen (vgl. Abb. 15), aus dem das Elastizitätsmodul E der Probe ermittelt werden kann [118]. So lange die Probe im linear elastischen Bereich gedehnt wird, steigt die Zugspannung linear an. Zu Beginn der Messung liegen also alle Messwerte auf einer Geraden, deren Steigung dem E-Modul entspricht.

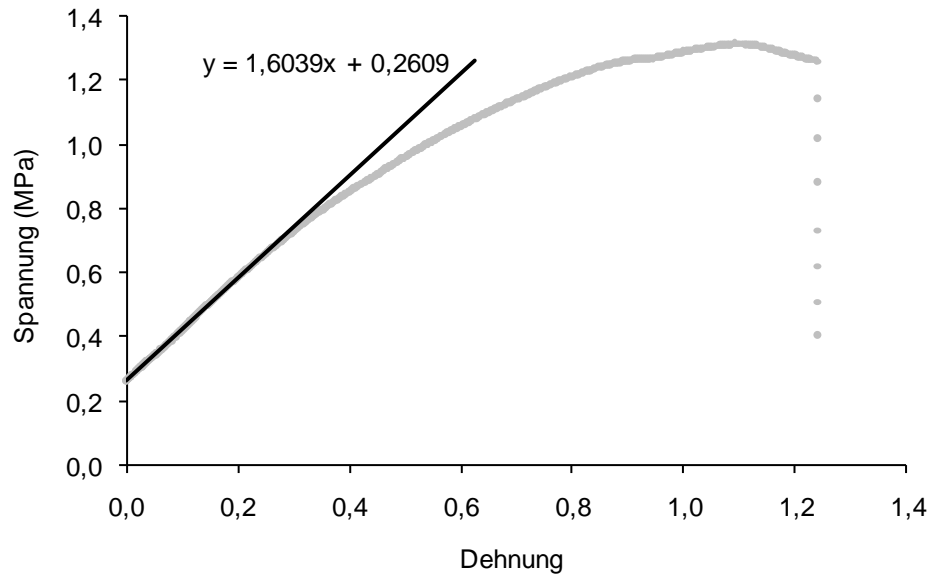


Abb. 15: Charakteristisches Spannung-Dehnungs-Diagramm eines Alginatfilms (Alginatlösung enthielt 5% Glycerol).

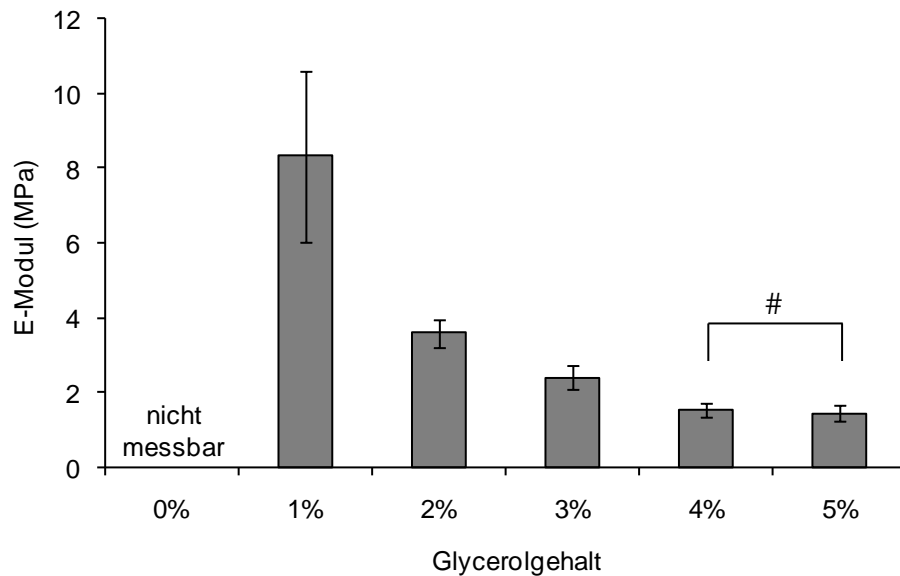


Abb. 16: Elastizitätsmodule der Alginatfilme in Abhängigkeit des Glycerolgehalts der Alginatlösungen (alle signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$), außer #).

Die für die verschiedenen Alginatfilme ermittelten E-Module werden in Abb. 16 miteinander verglichen. Der Film ohne Weichmacher konnte nicht mit dieser Methode vermessen werden, da er zu spröde war und bei jedem Versuch, ihn in die gewünschte Form zu schneiden oder zu stanzen, sofort zersplitterte. Der Vergleich zeigt deutlich die Abnahme des Elastizitätsmoduls bis zu einer Glycerolkonzentration von 4%, danach blieb der Wert konstant. Je

kleiner das Elastizitätsmodul ist, desto weniger Widerstand setzt ein Material seiner Verformung entgegen, das heißt das entsprechende Material wird weicher und flexibler [118]. Durch den Zugversuch konnte also die beobachtete Zunahme der Flexibilität auch gemessen werden und es zeigte sich, dass durch die Einarbeitung von Glycerol die Alginatmatrix konzentrationsabhängig weicher wird. Dabei reicht schon eine Konzentration von 1% Glycerol aus, um die Inserte leichter ausstanzen zu können, ohne dass die Matrix dabei zerbricht (vgl. Abb. 17 und Abb. 12). Die Filme mit hohem Glycerolgehalt waren allerdings klebriger als die anderen, weshalb zur Insertherstellung von nun an der Alginatlösung standardmäßig 1% Glycerol zugesetzt wurde.

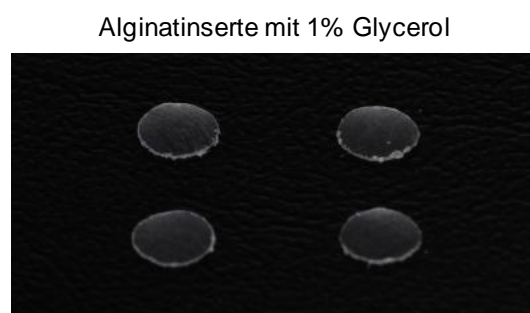


Abb. 17: Aus getrocknetem Film ausgestanzte Augeninserte.
(Alginatlösung enthielt 1% Glycerol)

2.3 Sterilisation der Alginate

Augeninserte müssen, wie alle Arzneiformen zur Anwendung am Auge, steril sein [32]. Obwohl sie wünschenswert wäre, ist eine Endsterilisation der hier entwickelten Inserte aus mehreren Gründen kaum möglich. Der Wirkstoff EGF ist als Peptid hitzeempfindlich [85] und sollte deswegen nicht autoklaviert werden. Bei einer Sterilisation mit feuchter Hitze verändert sich auch die Alginatmatrix selbst, da die Polysaccharidketten bei erhöhter Temperatur depolymerisieren [84; 30]. Zu dem gleichen Ergebnis würde eine Sterilisation durch Gammastrahlen führen, weshalb auch diese nicht eingesetzt werden sollte [84]. Daher muss die Herstellung der sterilen Augeninserte unter aseptischen Bedingungen erfolgen, das heißt die Ausgangsstoffe werden einzeln sterilisiert und dann unter Bedingungen weiterverarbeitet, die eine mikrobielle Kontamination vermeiden. Als Sterilisationsmethode für Alginate wird dabei die Sterilfiltration empfohlen [30], eine weitere Möglichkeit könnte die Sterilisation des Alginats als Pulver durch trockene Hitze sein.

Der Einfluss dieser beiden Methoden auf die Alginatlösungen wurde mit Hilfe von rheologischen Messungen untersucht. Da Alginate strukturviskose Lösungen bilden, das heißt

die Viskosität ihrer Lösungen ist abhängig von der Schergeschwindigkeit, kann kein einzelner Wert für die Viskosität angegeben werden. Stattdessen werden strukturviskose Lösungen am rotierenden Rheometer mit kontinuierlich steigender Schergeschwindigkeit vermessen und dabei Fließkurven aufgezeichnet, anhand derer die Viskosität verschiedener Lösungen verglichen werden kann [37]. Dabei hat vor allem die Länge der Polysaccharidkette einen Einfluss auf die Viskosität der Alginatlösungen: Je länger diese ist, desto höher ist auch die Viskosität der Lösung. Mit Hilfe des rotierenden Rheometers kann also eine Änderung des Polymerisationsgrades des Alginats nachgewiesen werden.

Abb. 18 zeigt die deutlich niedrigere Viskosität der Alginatlösungen nach der Sterilisation des jeweiligen Pulvers mit trockener Hitze. Das Ergebnis spricht für eine deutliche Verkürzung der Polysaccharidkette durch die Hitzebehandlung. Wie von Fagerson am Beispiel der Cellulose gezeigt wurde, können mit einer Depolymerisation einhergehende Abbaureaktionen von Polysacchariden bereits bei etwa 100°C ablaufen [33]. Zur Sterilisation mit trockener Hitze muss die Temperatur über eine Zeitspanne von zwei Stunden mindestens 160°C betragen, so dass es durchaus zu einer Depolymerisation kommen kann. Die Heißluftsterilisation ist daher für Alginat nicht geeignet.

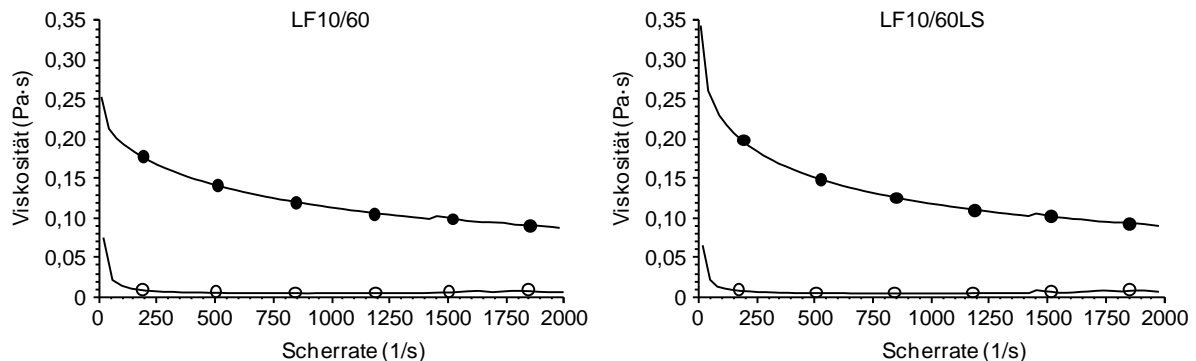


Abb. 18: Fließkurven der beiden Alginat-Lösungen vor (●) und nach (○) der Sterilisation des Pulvers durch trockene Hitze.

LF10/60 – Alginat mit hohem G-Anteil

LF10/60LS – Alginat mit niedrigem G-Anteil

Die Sterilfiltration kann dagegen bei Raumtemperatur erfolgen. Dabei werden Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm benutzt, um Lösungen von Keimen zu befreien. Wie Abb. 19 zeigt, ändert sich die Viskosität von Alginatlösungen nicht wesentlich durch die Filtration. Dieses Ergebnis stimmt mit der Literatur überein, die für die Sterilisation von Alginaten eindeutig die Filtration bevorzugt [84; 139]. Ein Nachteil der Methode ist allerdings, dass wegen der geringen Porengröße der Filter nur verdünnte Lösungen mit niedriger Viskosität

filtriert werden können. Die in diesem Versuch verwendeten 2%igen Alginatlösungen konnten nur mit hohem Druck durch den Sterilfilter gepresst werden. Da mit dem Druck auch das Risiko eines Filterdurchbruchs steigt, ist eine geringere Alginatkonzentration von nur einem Prozent eher zu empfehlen.

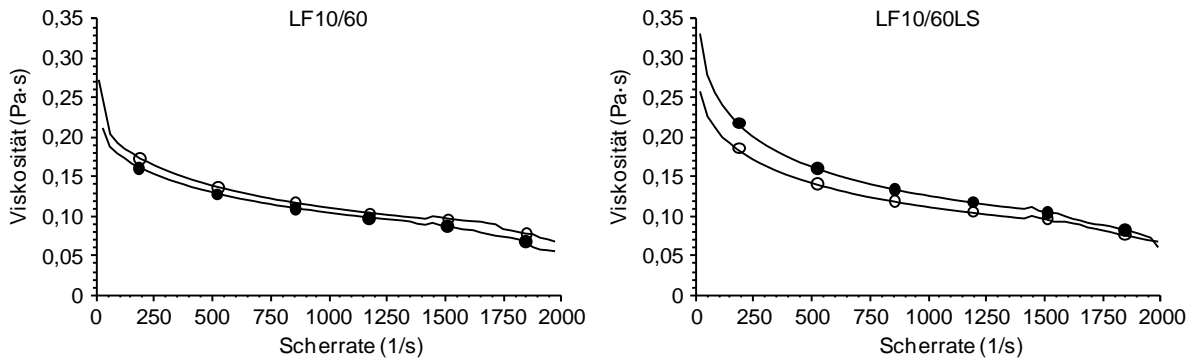


Abb. 19: Fließkurven der Alginatlösungen vor (●) und nach (○) der Sterilfiltration.
 LF10/60 – Alginat mit hohem G-Anteil
 LF10/60LS – Alginat mit niedrigem G-Anteil

3. Zusammenfassung

Zur Herstellung der Alginatmatrix wurden zwei verschiedene Methoden etabliert. Dabei war die einfache Teflonschale brauchbarer als das Filmziehgerät, da mit ihrer Hilfe auch niedrigviskose Flüssigkeiten gut verarbeitet werden können. Auch zur Quervernetzung des Alginats wurden zwei Methoden getestet, die äußere und die innere Gelierung. Die innere Gelierung erwies sich als besser geeignet, da hier die Quervernetzung während der Trocknung abläuft und deswegen der zweite lange Trocknungsschritt entfällt. Die innere Gelierung wird in Kapitel 4 genauer untersucht. Weil beide Gelierungsmethoden zu starren und spröden Augeninserten führten, die schon beim Ausstanzen leicht zerbrachen, wurde der Effekt des Weichmachers Glycerol auf die Alginatmatrix untersucht. Ein Zusatz von 1% zur Alginatlösung reichte aus, um diese deutlich flexibler und weicher zu machen. Durch eine Erhöhung der Glycerolkonzentration auf bis zu 5% wurden die Inserte zwar noch etwas weicher, aber vor allem deutlich klebriger. Zuletzt wurden zwei Sterilisationsmethoden für Alginat getestet, wobei sich die Sterilfiltration wie erwartet als am geeignetsten herausstellte.

Kapitel 4

Rheologische Untersuchung der Quervernetzung von Alginaten

1. Einleitung

Alginat bilden viskose Lösungen, die durch den Kontakt mit mehrwertigen Kationen quervernetzt werden und dann ein elastisches Gel ausbilden. Im Gegensatz zur äußeren Gelierung, bei der zwei Lösungen in Kontakt miteinander treten, kann die Zunahme der Elastizität bei der inneren Gelierung gut mittels oszillierender Rheometrie vermessen werden, da hier die Kationen schon in der Probe vorliegen.

Rheologie ist die Wissenschaft vom Fließen und von der Deformation von Materie, die sich mit den grundlegenden Beziehungen zwischen Kräften und den daraus resultierenden Verformungen beschäftigt [92]. Fließen kann als anhaltende Deformation einer Flüssigkeit unter der Einwirkung einer Kraft von außen verstanden werden, man spricht dann von einer viskosen Deformation. Für diese gilt im Idealfall das Newton'sche Gesetz, wonach die aufgewendete Kraft pro Fläche (auch Schubspannung τ [Pa] genannt) der zeitlichen Änderung der mechanischen Verformung (in der Rheologie auch Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$ [s⁻¹] genannt) proportional ist:

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (1)$$

Der Proportionalitätsfaktor η wird dynamische Viskosität [Pa·s] genannt. Die mechanische Verformung γ ist in diesem Fall eine Scherung, das heißt die relative Verschiebung von Flüssigkeitsschichten zueinander. Die *Schergeschwindigkeit* $\dot{\gamma}$ ist deren zeitliche Änderung, also $\dot{\gamma} = d\gamma/dt$ [4].

Eine weitere Art der Verformung ist die sogenannte elastische Deformation von Festkörpern, für die im Idealfall das Hooke'sche Gesetz gilt. Danach ist die aufgewendete Kraft pro Flächeneinheit τ direkt proportional zur Verformung γ , die in diesem Fall eine Längenänderung darstellt. Der Proportionalitätsfaktor heißt hier Elastizitätsmodul G [Pa]:

$$\tau = G \cdot \gamma \quad (2)$$

Einige Materialien zeigen bei mechanischer Beanspruchung ein besonderes, sogenanntes viskoelastisches Verhalten, das zwischen dem von Flüssigkeiten und Feststoffen liegt [37]. Diese Stoffe können unter langer Krafteinwirkung fließen wie Flüssigkeiten, zeigen aber elastisches Verhalten wenn sie kleinen, sich schnell ändernden Deformationen ausgesetzt werden. Als Modell für solche Substanzen wird oft die Reihenschaltung einer Feder und eines Stoßdämpfers beschrieben, das sogenannte Maxwell-Modell (vgl. Abb. 20). Zieht man langsam mit einer Kraft F an der Feder, wird diese kaum gedehnt und der Stoßdämpfer folgt der Krafteinwirkung schnell (d. h. das Material fließt). Zieht man jedoch schnell an der Feder,

wird diese gedehnt und der Stoßdämpfer wird erst anschließend durch die Zugkraft der Feder bewegt. Die Fließbewegung von viskoelastischen Materialien tritt also bei schnellen Kraftwirkungen verzögert ein [4]. Lässt die Kraft schnell genug wieder nach, verformt sich das Material lediglich elastisch und wird nach der Scherung seine ursprüngliche Form wieder annehmen.



Abb. 20: Reihenschaltung von Feder und Stoßdämpfer als Modellvorstellung für viskoelastische Stoffe (Maxwell-Modell).

Um die Fließeigenschaften eines solchen Materials zu charakterisieren, werden oszillierende Messungen vorgenommen, mit denen man die elastische Komponente der Deformation getrennt von der viskosen Komponente aufzeichnen kann [4]. Dabei befindet sich die Probe zwischen zwei Platten, von denen eine mit geringer Amplitude oszilliert und somit eine sinusförmig variierende Scherung der Probe bewirkt. Diese Scherung wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\gamma(t) = \gamma^0 \cdot \sin \omega t \quad (3)$$

wobei ω für die Oszillationsfrequenz steht und γ^0 die maximale Scherung darstellt, die die Probe bei maximaler Auslenkung der oszillierenden Platte erfährt [74]. Durch Ableitung dieser Funktion nach der Zeit ergibt sich die dabei auftretende Schergeschwindigkeit zu

$$\dot{\gamma}(t) = \gamma^0 \cdot \omega \cdot \cos \omega t \quad (4)$$

Aus diesen beiden Gleichungen wird ersichtlich, dass die Schergeschwindigkeit im Vergleich zur Deformation um 90° phasenverschoben verläuft. Für ideal elastische Proben, die dem Hooke'schen Gesetz (Gleichung (2)) folgen, ergibt sich die während der Deformation auftretende Schubspannung τ als Funktion der Zeit zu

$$\tau(t) = G' \cdot \gamma(t) = G' \cdot \gamma^0 \cdot \sin \omega t. \quad (5)$$

Dagegen gehorchen ideal viskose Proben dem Newton'schen Gesetz (s. Gleichung (1)), sind also der *Schergeschwindigkeit* (s. Gleichung (4)) proportional:

$$\tau(t) = \eta \cdot \dot{\gamma}(t) = \eta \cdot \omega \cdot \gamma^0 \cdot \cos \omega t \quad (6)$$

Bei der Vermessung einer ideal elastischen Probe würden die Deformation und die Schubkraft also miteinander in Phase verlaufen, während bei einer ideal viskosen Probe die Schubkraft

um 90° phasenverschoben wäre [92]. In Analogie zu Gleichung (5) kann der Term $\gamma \cdot \omega$ durch einen neuen Proportionalitätsfaktor G'' ersetzt werden. Dann ergibt sich für viskoelastische Materialien die Schubspannung als Kombination der Gleichungen (5) und (6):

$$\tau(t) = G' \cdot \gamma^0 \cdot \sin \omega t + G'' \cdot \gamma^0 \cdot \cos \omega t \quad (7)$$

G' und G'' heißen Speichermodul bzw. Verlustmodul und repräsentieren die elastische bzw. die viskose Komponente der Probe. Wird eine viskoelastische Probe vermessen, verlaufen die Schubkraft und die Deformation um einen Winkel δ verschoben zueinander:

$$\tau(t) = G^* \cdot \gamma^0 \cdot \sin(\omega t + \delta) \quad (8)$$

Diese Phasenverschiebung δ liegt zwischen 0° und 90° und dient als Maß für die Elastizität der Probe. Viskoelastische Flüssigkeiten, die eher viskose Eigenschaften zeigen, ergeben Werte größer als 45° , Werte unter 45° sind charakteristisch für viskoelastische Festkörper wie zum Beispiel quervernetzte Gele, die vorwiegend elastische Eigenschaften zeigen. Der in Gleichung (8) verwendete Proportionalitätsfaktor G^* setzt sich aus einem realen Teil (dem Speichermodul G') und einem imaginären Teil (dem Verlustmodul G'') zusammen [74]:

$$G^* = G' + iG'' \quad (9)$$

Mit Oszillationsmessungen ist es auch möglich, die Quervernetzung von Hydrogelen zu verfolgen [74]. Dazu wird die zeitliche Entwicklung der Phasenverschiebung sowie der beiden Module G' und G'' aufgezeichnet. Als Gelierungsdauer wird der Kreuzungspunkt von Speicher- und Verlustmodul angesehen [10], bei dem die Phasenverschiebung δ einen Wert von 45° annimmt. Bei logarithmischer Auftragung nähert sich im weiteren Verlauf der Messung der Betrag des komplexen Moduls $|G^*|$ einem Plateau, dessen Höhe als Maß für die Gelstärke dient.

Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Versuche war die Charakterisierung der inneren Gelierung von Alginaten durch eine langsame Verringerung des pH-Werts mittels Glucono- δ -lacton. Mit den Ergebnissen sollte die Herstellungsmethode für die Augeninserte optimiert werden. Dazu wurde zunächst anhand einer CaHPO_4 -Suspension der Einfluss der Calcium- und der GDL-Konzentration auf die Gelierungsdauer zweier Alginattypen untersucht. Da sich zwischenzeitlich die Ca-EDTA-Lösung als besser geeignet erwies, wurde auch von dieser die Gelierungsdauer gemessen, diesmal in Abhängigkeit vom eingestellten pH-Wert und von der GDL-Konzentration. Zusätzlich wurde die Gelstärke in Abhängigkeit von der GDL-Konzentration bestimmt.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Innere Gelierung mittels CaHPO_4 /GDL

Zur Quervernetzung der Alginat wurden diese unter rühren in einer CaHPO_4 -Suspension gelöst. Durch Zugabe von Glucono- δ -lacton (GDL) wird die Quervernetzung ausgelöst, da dieses durch Hydrolyse den pH-Wert der Alginatlösung verringert und sich somit das CaHPO_4 löst. Die Versuche wurden mit zwei verschiedenen Alginaten durchgeführt, die sich nur in ihrer quantitativen Zusammensetzung aus Guronsäure- und Mannuronsäure-Einheiten unterschieden. Variiert wurden jeweils die Menge an Calciumhydrogenphosphat und Glucono- δ -lacton. Abb. 21 zeigt die Ergebnisse der Versuche mit dem Guronsäure-reichen Alginat (LF10/60). Man erkennt, dass zu Beginn der Messungen bei allen Versuchen das Speichermodul G' noch kleiner ist als das Verlustmodul G'' , das heißt die Probe liegt noch als viskose Suspension vor. Mit der Zeit steigt G' jedoch an, wobei die Geschwindigkeit dieser Zunahme von den verwendeten Konzentrationen des Calciumsalzes bzw. des Lactons

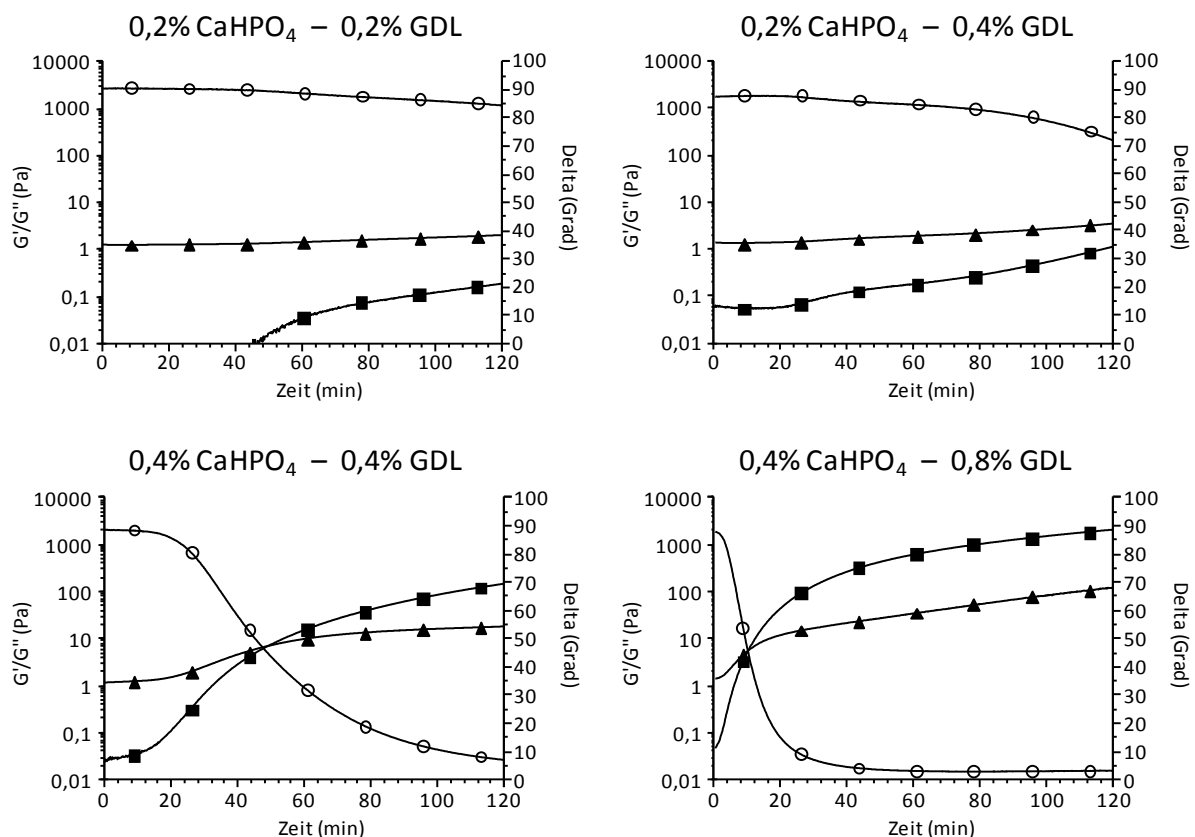


Abb. 21: Innere Gelierung des „G-reichen“ Alginates (LF10/60) durch verschiedene Konzentrationen von CaHPO_4 und GDL.

■ - Speichermodul (G') ▲ - Verlustmodul (G'') ○ - Phasenverschiebung (δ)

abhängt. Sobald sich die beiden Kurven kreuzen und G' größere Werte als G'' annimmt, überwiegen die elastischen Eigenschaften in der Probe. Die bis zu diesem Kreuzungspunkt vergangene Zeit wird als Gelierungsdauer bezeichnet. Im Falle des „G-reichen“ Alginats (LF10/60) reicht eine CaHPO_4 -Konzentration von 0,2% (das entspricht einem Zehntel der verwendeten Alginatkonzentration) nicht aus, um innerhalb der Messdauer von zwei Stunden ein Gel zu bilden. Eine Verdoppelung der GDL-Konzentration beschleunigt zwar die Gelierung, was an der stärkeren Annäherung der beiden Module G' und G'' am Ende der Messung erkennbar ist, aber die Probe bleibt trotzdem überwiegend viskos (s. Abb. 21, obere Reihe). Eine Messung bei erhöhter Temperatur zeigt jedoch, dass 0,2% CaHPO_4 für die Quervernetzung ausreichen. Bei 50°C hydrolysiert GDL schneller, so dass sich mehr CaHPO_4 in kürzerer Zeit löst und es nach ungefähr 100 min zu der gewünschten Kreuzung der Module kommt (Abb. 22). Das Gel wird aber nur schwach quervernetzt, was an dem kleinen Wert für G' erkennbar ist. Eine deutliche Verkürzung der Gelierung kann durch eine Verdoppelung der Ca^{2+} -Konzentration erreicht werden. Bei gleicher GDL-Konzentration (beide 0,4%) überwiegen nach etwa 51 min die elastischen Eigenschaften in der Probe, bei der doppelten Menge GDL (0,8%) sogar schon nach nur etwa 12 min (s. Abb. 21, untere Reihe). Außerdem liegt G' am Ende der Messung um circa ein bis zwei Zehnerpotenzen höher, diese Gele sind also deutlich fester.

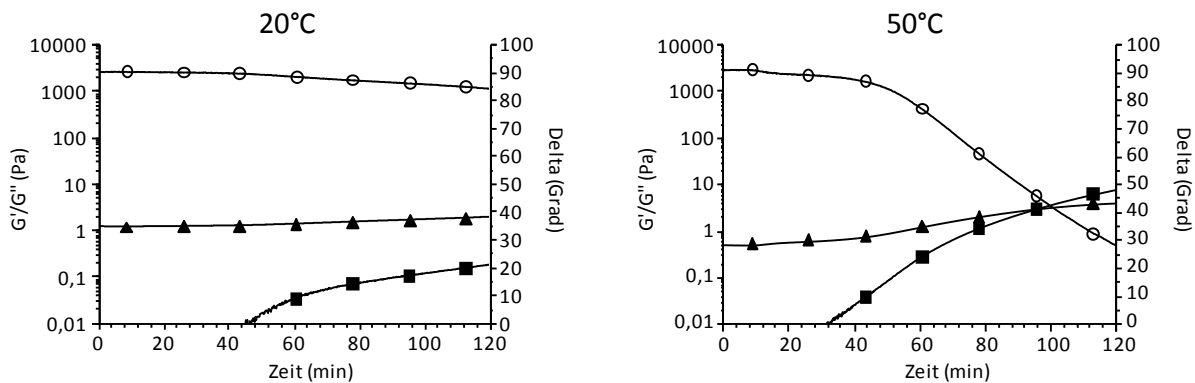


Abb. 22: Innere Gelierung des „G-reichen“ Alginats (LF10/60) bei verschiedenen Temperaturen. Beide Experimente wurden mit 0,2% CaHPO_4 und 0,2% GDL durchgeführt.

■ - Speichermodul (G') ▲ - Verlustmodul (G'') ○ - Phasenverschiebung (δ)

Die dritte Kurve in den Grafiken der Abb. 21 und Abb. 22 zeigt den Winkel δ der Phasenverschiebung, der als Maß für die Elastizität der Probe dient. Ein Wert von 90° zeigt ein idealviskoses Verhalten der Probe, ein Wert von 0° wäre für eine idealelastische Probe zu messen. Die Phasenverschiebung erreicht den Wert 45°, wenn sich das Verlust- und das

Speichermodul kreuzen. Am Abfall der Phasenverschiebung kann man gut die Geschwindigkeit der Quervernetzung beurteilen. Bei der ersten Probe bleibt der Wert während der kompletten Messzeit nahezu konstant, da die Gelierung sehr langsam abläuft. Die zweite Messung zeigt die beginnende Quervernetzung gegen Ende der Versuchszeit, aber erst mit der Erhöhung der Calciumionenkonzentration verändert sich das Verhalten der Probe vollständig von viskos zu elastisch. Mit gleichen Anteilen GDL und CaHPO_4 verläuft der Abfall von δ über einen Zeitraum von annähernd zwei Stunden, durch eine Verdoppelung der GDL-Konzentration kann der Übergang von der viskosen Lösung zum elastischen Gel auf etwa 40 min verkürzt werden.

Das zweite Alginat (LF10/60LS) enthält weniger Guluronsäureeinheiten in seiner Polysaccharidkette („G-arm“). Damit wurden die gleichen Experimente durchgeführt, wobei sich die beiden Module dieses Mal in allen Versuchen kreuzten. Der direkte Vergleich der Gelierungsdauer zeigt, dass die Quervernetzung mit diesem Alginat deutlich schneller abläuft (s. Abb. 23). Auch zeigt sich erneut der oben beschriebene Trend, dass die Gelierungsdauer sowohl mit zunehmender GDL- als auch Ca^{2+} -Konzentration abnimmt, wobei der Unterschied bei der Ca^{2+} -Konzentration hier weniger stark ausfällt.

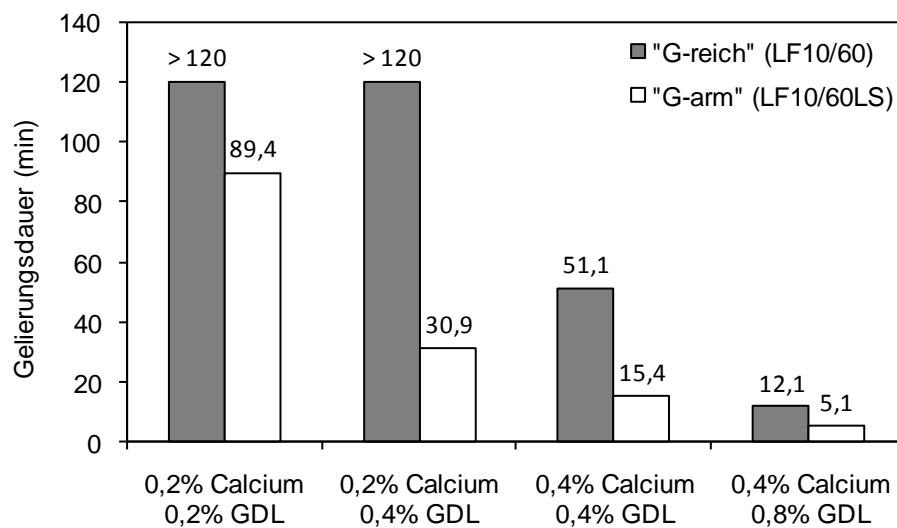


Abb. 23: Gelierungsdauer der verschiedenen Alginat in Abhängigkeit von der Ca^{2+} - und GDL-Konzentration.

Abb. 24 zeigt auf der linken Seite die polarisationsmikroskopische Aufnahme einer CaHPO_4 -Suspension in der Alginatlösung vor der rheologischen Vermessung. Makroskopisch betrachtet war die Dispersion getrübt, mikroskopisch kann man relativ viele Kristalle deutlich als helle Punkte erkennen. Die Gelierungsdauer betrug hier circa 30 min, danach verringerte sich der Winkel der Phasenverschiebung aber noch weiter, bis am Ende der Messung die

Probe vorwiegend elastische Eigenschaften zeigte ($\delta \approx 0$). Im polarisierten Licht zeigten sich in dem eigentlich klar erscheinenden Gel noch immer CaHPO_4 -Kristalle (rechtes Bild in Abb. 24). Die Quervernetzung war also trotz des geringen Winkels δ noch nicht komplett abgeschlossen, sondern das Gel hätte sich noch weiter verfestigt. Dementsprechend hatte das Speichermodul (als näherungsweise Maß für die Festigkeit) am Ende der Messung noch kein Plateau erreicht, wie es auch bei den Messungen mit dem „G-reichen“ Alginat (LF10/60) zu beobachten war (vgl. Abb. 21).

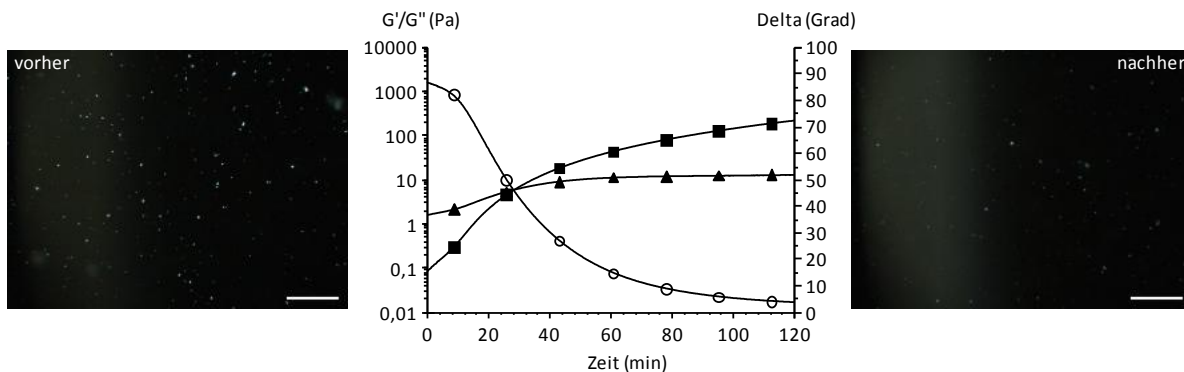


Abb. 24: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Dispersion vor der Messung (links) und des nach der Messung resultierenden klaren Alginatgels (rechts).

Wie die Versuche zeigten, können Alginat durch die innere Gelierung mittels CaHPO_4 -Suspension gut quervernetzt werden und die Quervernetzung kann durch die einfache Variation der eingesetzten Calcium- und GDL-Mengen gut gesteuert werden. Dennoch ist sie als Methode zur Herstellung von Augeninserten weniger gut geeignet, weil eine Suspension nur schwer zu sterilisieren ist. Zur Sterilisation sollten Alginat immer sterilfiltriert werden, da es durch Hitzeeinwirkung leicht zu einer Änderung ihres Polymerisationsgrads kommt [84]. Deswegen müssten bei der Herstellung der Augeninserte die Alginatlösung und das Calciumsalz einzeln sterilisiert und danach unter aseptischen Bedingungen weiter verarbeitet werden. Um eine mikrobielle Kontamination des Produkts zu vermeiden, sollte bei Arbeiten unter aseptischen Bedingungen die Anzahl der Arbeitsschritte möglichst gering gehalten werden. Daher wäre eine gemeinsame Sterilfiltration der Alginatlösung und der Calciumquelle zu bevorzugen. Eine solche Möglichkeit bietet die pH-abhängige Komplexbildung der Ca^{2+} -Ionen mittels EDTA, wie sie im folgenden Abschnitt 2.2 beschrieben wird.

2.2 Innere Gelierung mittels $\text{CaCl}_2/\text{EDTA}$

Die innere Gelierung von Alginaten kann auch mit einem löslichen Calciumsalz vorgenommen werden, wenn die Ca^{2+} -Kationen zunächst komplexiert vorliegen. Analog der CaHPO_4 -Methode wird dann mit Glucono- δ -lacton durch eine langsame Verringerung des pH-Wertes die Stabilität des Komplexes herabgesetzt, so dass die Ca^{2+} -Kationen freigesetzt werden. Der Vorteil dieser Methode ist die leichter durchzuführende Sterilisation, da die AlginateLösung mitsamt den Calciumionen sterilfiltriert werden kann, bevor die Gelierung einsetzt.

Löst man CaCl_2 gemeinsam mit $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ in Wasser auf, bildet sich ein Ca-EDTA-Komplex, dessen Stabilität pH-abhängig ist [31]. Bei niedrigen pH-Werten ist dieser Komplex weniger stabil, das heißt es liegen mehr Ca^{2+} -Ionen in freier Form vor. Da die Lösung zunächst leicht sauer ist, muss sie vor der Zugabe des Alginats neutralisiert werden um eine sofortige Gelierung zu vermeiden. Nach der Zugabe von GDL bleibt die Lösung sogar bei 50°C noch lange genug flüssig, um sie zu filtrieren (s. Abb. 25). Die Umwandlung in ein elastisches Gel erfolgt dann relativ schnell (Abnahme von δ), jedoch dauert die Verfestigung noch deutlich länger an, was am weiteren Anstieg von G' erkennbar ist.

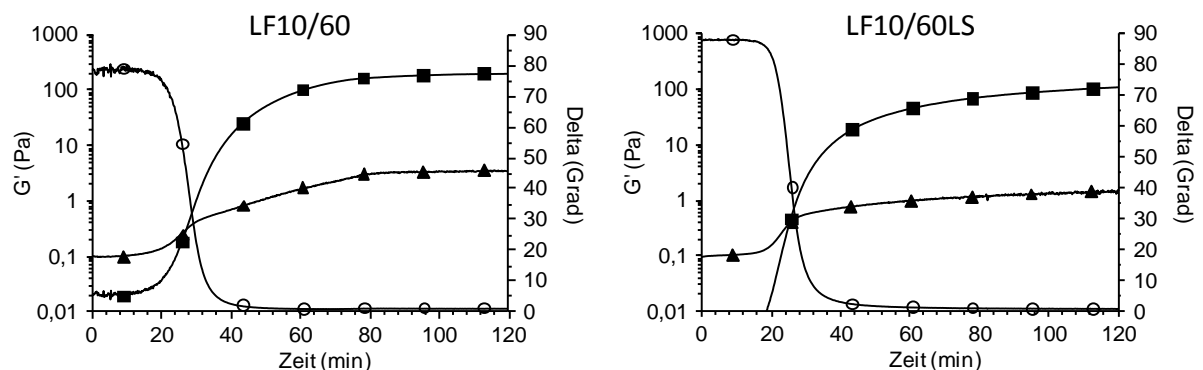


Abb. 25: Innere Gelierung einer 1%igen AlginateLösung mit 1% CaCl_2 und 1% GDL bei 50°C .
 ■ - Speichermodul (G') ▲ - Verlustmodul (G'') ○ - Phasenverschiebung (δ)

2.2.1 Variation des pH-Wertes vor der Gelierung

Die bei der Herstellung der AlginateLösung erforderliche Neutralisierung der ungepufferten Ca-EDTA-Lösung muss sehr vorsichtig geschehen, da der neutrale Bereich dabei sehr schnell durchlaufen wird. Die Herstellung könnte wesentlich vereinfacht werden, wenn zum Auflösen des Alginats die Lösung nicht neutralisiert, sondern lediglich der pH-Wert erhöht werden müsste bzw. wenn der in Frage kommende pH-Bereich größer als 7 bis 7,5 wäre. Daher

wurde die pH-Abhängigkeit der Gelierung genauer untersucht, indem die Ca-EDTA-Lösung vor der Zugabe von Alginat auf bestimmte pH-Werte im Bereich von 6 bis 11 eingestellt wurde. In den daraus gebildeten Alginatlösungen wurde der pH-Wert gemessen und deren Gelierung wurde bei 25°C am Rheometer untersucht.

Der Graph auf der linken Seite in Abb. 26 zeigt ein für diese Versuche typisches Rheogramm, wie es für die Lösung mit pH 7,05 gemessen wurde. Im Gegensatz zu den oben gezeigten Rheogrammen steigt das Speichermodul G' hier sofort nach Beginn der Messung leicht an. Aber erst nach etwa 60 min beschleunigt sich die Gelierung deutlich, was auch gut an der Phasenverschiebung δ zu erkennen ist. Dieser Kurvenverlauf ist in allen Messungen zur pH-Abhängigkeit zu beobachten, wobei die Beschleunigung immer zwischen 0,02 und 0,05 Pa auftritt. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die autokatalytische Hydrolyse des Glucono- δ -lactons sein [132]. Dabei entsteht Gluconsäure, deren Protonen die Hydrolyse-reaktion beschleunigen. Da der pH-Wert deshalb schneller sinkt, werden die Ca^{2+} -Ionen schneller aus dem Komplex freigesetzt und das Gel bildet sich schneller aus. Die Messungen bei 50°C zeigen dieses Phänomen nicht, da hier die Reaktion aufgrund der erhöhten Reaktion schneller abläuft.

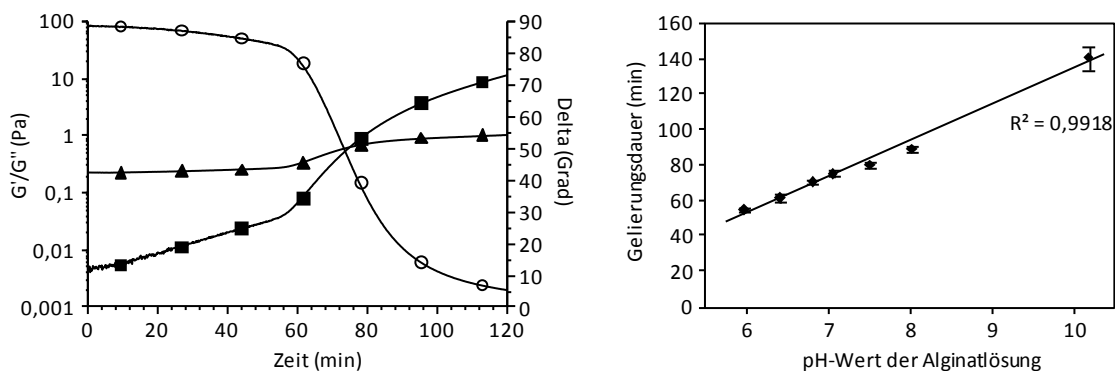


Abb. 26: pH-Abhängigkeit der Gelierungsdauer bei 25°C.

Links: Typisches Rheogramm mit zu Beginn langsamerer Gelierung.

Rechts: Gelierungsdauer in Abhängigkeit vom pH-Wert ($n = 3$).

Vergleicht man die einzelnen Lösungen miteinander, zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Gelierungsdauer und dem pH-Wert der Alginatlösung (s. Abb. 26, rechts). Die Lösung mit dem niedrigsten pH-Wert (5,95) war allerdings leicht trüb und ließ sich nicht mehr sterilfiltrieren. Trotzdem ergibt sich daraus eine Vereinfachung für die Herstellung der Gele, da die CaCl_2 -EDTA-Lösung nicht (wie vorher angenommen) möglichst genau neutralisiert werden muss. Ihr pH-Wert sollte lediglich über 7 liegen und die Quervernetzung erfolgt selbst dann noch, wenn die Lösung versehentlich überneutralisiert wird (pH 10,2). Da zur

Herstellung von Augeninserten aus dem quervernetzten Gel dieses vorher getrocknet werden muss (s. Kapitel 3) und dieser Trocknungsvorgang etwa 2 Tage dauert, spielt die durch den hohen pH-Wert bedingte Verlängerung der Gelierungsdauer für die Herstellung von Augeninserten keine wesentliche Rolle.

2.2.2 Variation der GDL-Konzentration

Der durch Glucono- δ -lacton verringerte pH-Wert im Gel könnte zu Unverträglichkeiten bei der späteren Anwendung der Augeninserte führen. Daher wurde auch untersucht, ob die eingesetzte Menge GDL verändert werden kann, ohne die Eigenschaften des Gels wesentlich zu beeinflussen. Dazu wurden in den Alginatlösungen verschiedene Konzentrationen des Lactons gelöst und diese Lösungen dann am oszillierenden Rheometer bei 50°C vermessen. Durch die erhöhte Temperatur kann die Gelierungszeit verkürzt werden, da hier vor allem das Ausmaß der Quervernetzung, also die Gelstärke, von Interesse ist. Um diese zu messen wurde nach Ablauf der Gelierung die Amplitude der oszillierenden Schubspannung τ kontinuierlich von 0,1 auf 1000 Pa erhöht und dabei der Betrag des komplexen Moduls $|G^*|$ gemessen. Solange die Probe im linear viskoelastischen Bereich geschert wird, bleibt $|G^*|$ konstant. Geht die Belastung jedoch über den linearen Bereich hinaus, wird das Gelgerüst zerstört und der Wert nimmt rapide ab. Je stabiler ein Gel ist, desto größer ist der linear viskoelastische Bereich und desto größere oszillierende Belastungen hält das Gelgerüst aus [93]. Die maximale oszillierende Schubspannung unmittelbar vor der Zerstörung des Gelgerüsts kann also als Maß für die Gelstärke angesehen werden.

Wie Abb. 27 zeigt, unterscheiden sich die beiden Alginat bei der Verwendung von Ca-EDTA-Komplexen als Ca^{2+} -Quelle kaum hinsichtlich der Gelierungsdauer. Allerdings fällt auf, dass gerade bei niedrigen GDL-Konzentrationen die Gelierung relativ lange dauert. Um korrekte Ergebnisse zu erhalten und einen Einfluss der Gelierungszeit zu vermeiden, wurde vor der Vermessung des linear viskoelastischen Bereiches entsprechend länger gewartet, bis das Speichermodul konstante Werte annahm.

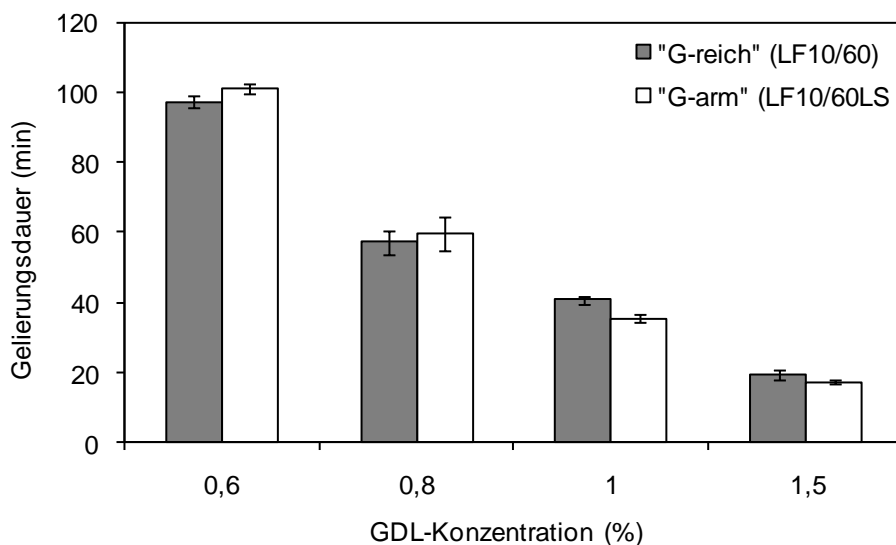
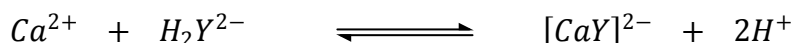


Abb. 27: Gelierungsdauer der beiden Alginattypen in Abhängigkeit von der verwendeten GDL-Konzentration.

Abb. 28 zeigt die Ergebnisse der Gelstärkemessungen für die beiden unterschiedlichen Alginattypen. Der augenscheinlichste Unterschied ist die geringere Festigkeit des „G-armen“ Alginats (LF10/60LS). Die Festigkeit von Gelen wird durch ihre Quervernetzung bedingt, das heißt stärker quervernetzte Gele sind auch von festerer Konsistenz [86]. Da in Alginaten vorwiegend die G-Reste mit den Ca^{2+} -Ionen interagieren [30], stimmt dieses Ergebnis also mit den Erwartungen überein. Die Festigkeit der Gele ist aber auch von der verwendeten GDL-Konzentration abhängig, wobei festere Gele entstehen, wenn mehr GDL eingesetzt wird. Da in allen Versuchen die gleiche Menge CaCl_2 eingesetzt wurde und nur freie, nicht-komplexierte Ca^{2+} -Ionen die Alginatketten quervernetzen können, beeinflusst GDL also die Menge der aus dem EDTA-Komplex herausgelösten Ca^{2+} -Kationen. Dies kann anhand der folgenden Reaktionsgleichung veranschaulicht werden (zur Vereinfachung steht hier „Y“ anstelle des EDTA-Moleküls; nach [31]):



Mit einer Erhöhung der Protonenkonzentration (d. h. einem niedrigeren pH-Wert) verschiebt sich das Gleichgewicht demnach auf die linke Seite. Je niedriger der pH-Wert also ist, desto mehr freie Ca^{2+} -Ionen liegen in der Lösung vor und können die Polysaccharidketten quervernetzen. Weil Glucono- δ -lacton in Wasser zu Gluconsäure hydrolysiert [23], wird der pH-Wert durch eine höhere GDL-Konzentration weiter verringert, was zu festeren Gelen führt.

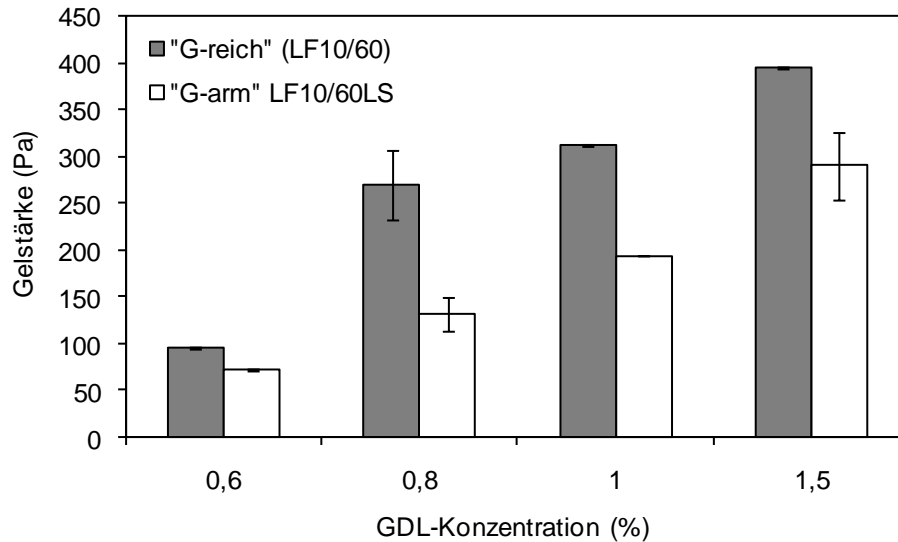


Abb. 28: Steifigkeit und Gelierungsdauer von Alginatgelen, die mit verschiedenen Konzentrationen GDL hergestellt wurden.

Wie die Abb. 28 zeigt, steigt die Gelstärke mit jedem Konzentrationsschritt an, ohne dass sich ein Plateau bildet. Daher ist anzunehmen, dass selbst bei der höchsten vermessenen GDL-Konzentration noch nicht alle Ca^{2+} -Ionen aus dem Komplex freigesetzt wurden. Auf eine weitere Erhöhung der GDL-Konzentration wurde aber bewusst verzichtet, da für eine vollständige Dissoziation des Ca-EDTA-Komplexes ein sehr niedriger pH-Wert von etwa 2-3 oder weniger notwendig wäre [31]. Ein so geringer pH-Wert würde sehr wahrscheinlich zu massiven Problemen bei der Anwendung der Augeninserte führen.

3. Zusammenfassung

Die Quervernetzung von Alginaten wurde zum einen untersucht, um die Methode der inneren Gelierung besser zu verstehen, zum anderen aber auch, um die Herstellung der Augeninserte zu verbessern. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden der inneren Gelierung verwendet, zunächst ein schwerlösliches Calciumsalz (CaHPO_4) und danach ein Ca-EDTA-Komplex, dessen Stabilität pH-abhängig ist. Es zeigte sich, dass zur Quervernetzung mit Hilfe von CaHPO_4 weniger Glucono- δ -lacton verwendet werden musste als für die Methode mit EDTA. Allerdings kann die Alginat- CaHPO_4 -Suspension nicht so leicht sterilisiert werden, weshalb die Komplexmethode vorzuziehen ist. Bei dieser kann die Quervernetzung ebenfalls durch die verwendete Menge GDL gesteuert werden. Außerdem wurde festgestellt, dass der Ausgangs-pH-Wert der Alginatlösung zwar bei der Dauer der Quervernetzung eine Rolle spielt, die Gele aber trotzdem mit der Zeit fest werden. Daher reicht es aus,

den pH-Wert der Ca-EDTA-Lösung vor dem Auflösen des Alginats auf größer sieben zu erhöhen, anstatt die Lösung möglichst genau zu neutralisieren. Die innere Gelierung hat auch bei der Verarbeitung von Peptiden wie EGF Vorteile, da die zweite lange Trocknungsperiode entfällt. Trotzdem könnte die Stabilität von EGF aufgrund des pH-Werts der Alginatlösung während der Herstellung beeinträchtigt werden. Die Untersuchung der Stabilität von EGF während der Quervernetzung wird in Kapitel 6 beschrieben.

Kapitel 5

In vitro Untersuchungen zur Auflösung von Alginat-Augeninserten

1. Einleitung

Wegen der Empfindlichkeit der Hornhaut gegenüber Fremdkörpern ist die Anwendung von Augeninserten immer mit einem Fremdkörpergefühl verbunden [29]. Da unlösliche Augeninserte ihre Eigenschaften während der Anwendung nicht verändern, persistiert dieses Gefühl während der gesamten Applikationsdauer. Durch ein lösliches Insert kann dieses Problem abgemildert werden, da der Fremdkörper langsam aus dem Auge verschwindet. Wichtiger ist jedoch die verbesserte Compliance der Patienten, die im Wesentlichen darauf beruht, dass lösliche Augeninserte nach der Applikation nicht mehr aus dem Auge entfernt werden müssen [124]. Gerade für ältere Patienten, die mit der Anwendung von Arzneimitteln am Auge generell Probleme haben [17], stellt ein lösliches Insert einen großen Vorteil dar.

Lösliche Augeninserte bestehen aus einer Matrix, die sich langsam in der Tränenflüssigkeit auflöst. Als Matrixbildner eignen sich vor allem hydrophile Polymere. Diese sollen sich langsam auflösen, damit eine möglichst lange Freisetzungsdauer erreicht werden kann. Bei Kontakt einer nicht quervernetzten, hydrophilen Polymermatrix (z. B. Natriumalginat) mit Wasser kommt es zunächst zu einer Quellung der Matrix. Dabei vergrößern sich die Abstände der einzelnen Molekülketten, bis es schließlich zur Entflechtung des Polymergerüsts kommt und die einzelnen Moleküle ins Lösungsmittel diffundieren [99]. Ein Film aus Natriumalginat löst sich daher relativ schnell im wässrigen Milieu auf. Werden aber zwischen den einzelnen Polymerketten Querverbindungen eingefügt, kann sich das somit entstehende dreidimensionale Netzwerk nicht mehr vollständig auflösen, sondern die Matrix wird lediglich quellen. Ein quervernetztes Hydrogel wird sich also nicht einfach auflösen, solange die Querverbindungen bestehen bleiben, sondern es muss zunächst das Netzwerk abgebaut werden. Die Polysaccharidketten in einer quervernetzten Alginatmatrix werden durch ionische Wechselwirkungen, an denen mehrwertige Kationen beteiligt sind, miteinander verbunden. Damit sich ein Alginatgel also wieder auflöst, müssen diese mehrwertigen Kationen (z. B. Ca^{2+}) erst wieder entfernt und durch einwertige Natriumionen ersetzt werden. Allerdings besitzt Alginat eine hohe Affinität zu Calciumionen [30], weshalb deren Austausch sehr lange dauert und einen hohen, mindestens 20-fachen Überschuss an einwertigen Kationen erfordert [102]. Die ionische Bindung ist so stark, dass sich Augeninserte, deren Matrix durch äußere Gelierung quervernetzt wurde, trotz der relativ hohen Natriumkonzentration in der Tränenflüssigkeit während einer Anwendungsdauer von zwei Tagen nicht auflösen [70]. Um trotzdem Augeninserte auf Alginatbasis herzustellen, die sich langsam in der Tränenflüssigkeit auflösen, müssen die Calciumionen daher „aktiv“ aus der Alginatmatrix entfernt werden. Das

könnte durch deren Komplexbildung mit dem Chelatbildner EDTA möglich sein, der mit Ca^{2+} -Ionen wasserlösliche Komplexe bildet.

Diese Möglichkeit wurde vorweg durch einfaches Zutropfen einer $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Lösung zum Inkubationsmedium getestet. Im nächsten Schritt sollten dann durch die Inkorporation des Komplexbildners in die Alginatmatrix lösliche Augeninserte hergestellt und deren Erosion in vitro untersucht werden. Um eine vorzeitige Komplexbildung der Ca^{2+} -Kationen während der Herstellung der Matrix zu verhindern, wurden zunächst Inserte mit einer 3-Schichtstruktur hergestellt, die $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ nur in der mittleren Schicht enthielten. In einem zweiten Versuch wurde EDTA in Form der freien Säure ($\text{H}_4\text{-EDTA}$) als Suspension verarbeitet. Beide Herstellungsmethoden lieferten Inserte, die sich in vitro in Puffer auflösten. Als dritte Möglichkeit wurden die in Kapitel 3 und 4 beschriebenen löslichen Augeninserte mit CaCl_2 und $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ getestet.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Tropfenweise Zugabe einer $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Lösung

Augeninserte, die aus einer mit Ca^{2+} -Kationen quervernetzten Alginatmatrix bestehen, setzen EGF über mehrere Stunden verzögert frei, ohne sich dabei aufzulösen [70]. Damit sich eine quervernetzte Alginatmatrix auflöst, müssen die Ca^{2+} -Kationen wieder aus der Bindung mit den Guluronsäureblöcken der Polysaccharidkette herausgelöst werden. Um zu testen, ob das mit EDTA möglich ist, wurden quervernetzte Inserte bei 37°C inkubiert und dem Puffer jede Stunde 1,25 mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ als Lösung zugetropft. Die schrittweise Zugabe von $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ war notwendig, da wegen der Quervernetzung durch Diffusion von außen die Menge an Calciumionen in den Inserten nicht bekannt war. Um das Ergebnis nicht zu verfälschen, wurde als Medium für die Inkubation ein phosphatfreier Tris-Puffer mit pH 7,4 gewählt, da Phosphationen mit Ca^{2+} -Kationen unlösliches Calciumphosphat bilden könnten.

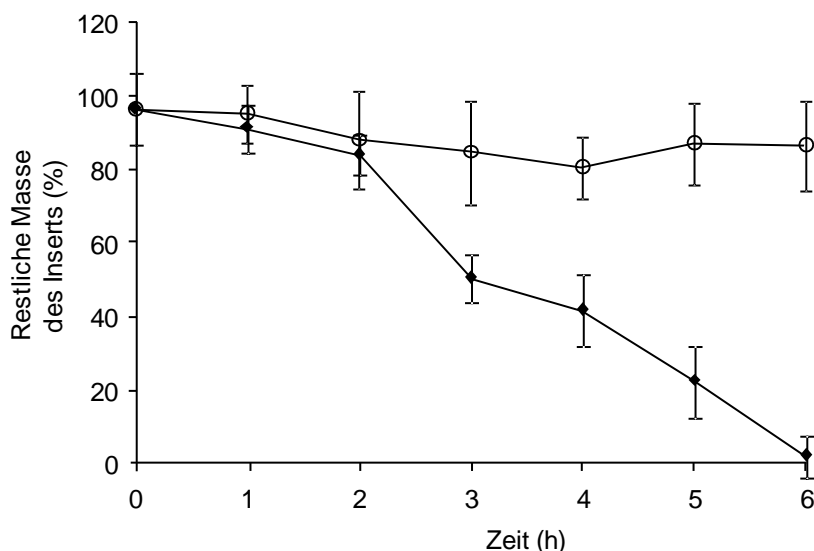


Abb. 29: Auflösung von Alginatinserten durch Zutropfen einer Na₂-EDTA Lösung (●) im Vergleich zur Kontrolle ohne Zugabe von EDTA (○).

Wie aus Abb. 29 ersichtlich wird, begann die Auflösung der Inserte durch Zugabe von Na₂-EDTA nach zwei Stunden, während sich die Masse in der Kontrollgruppe nicht wesentlich änderte. Nach sechs Stunden waren die Inserte komplett aufgelöst. Bei diesem Versuch wurde davon ausgegangen, dass sich ein Insert in einem Zeitraum von einer Stunde komplett auflöst, sobald genügend Na₂-EDTA zur Komplexbildung aller Ca²⁺-Ionen vorhanden ist. Bis zum kompletten Auflösen der Inserte wurden dem Puffer insgesamt 7,5 mg Na₂-EDTA zugeführt, was rein rechnerisch zur Komplexbildung von etwa 3 mg CaCl₂ ausreicht. Da ein Insert nur etwa 4 mg wog, wurde das Intervall von einer Stunde folglich zu kurz gewählt, um eine stöchiometrische Umsetzung zu erreichen. Bei einem längeren Intervall hätte auch weniger Na₂-EDTA zum kompletten Lösen der Inserte ausgereicht.

Im nächsten Schritt wurde EDTA in die Inserte eingearbeitet, da eine stündliche Gabe von Na₂-EDTA als Augentropfen wenig sinnvoll ist. Dazu wurde die Alginatmatrix durch die innere Gelierung quervernetzt, bei der eine definierte Menge Calciumsalz eingewogen wird. Bei dieser Methode ist also bekannt, mit wie viel Calcium die Matrix quervernetzt wird.

2.2 Inkorporation von EDTA in die Alginatmatrix

Zur Herstellung von löslichen Augeninserten, in deren Matrix der Komplexbildner bereits inkorporiert ist, wurden zunächst zwei Herstellungsmethoden etabliert, die beide die innere Gelierung mit CaHPO₄ und Glucono-δ-lacton zur Quervernetzung der Matrix nutzen. Des Weiteren kann mit diesen Methoden eine verfrühte Bildung des Ca-EDTA-Komplexes

verhindert werden, da EDTA und Ca^{2+} -Ionen während der Quervernetzung nicht miteinander in Kontakt kommen.

Bei der ersten Methode wurde wasserlösliches $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ als Komplexbildner verwendet. Die gesamte eingesetzte Menge $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ befand sich in der mittleren von drei Schichten, aus denen die Inserte aufgebaut waren. Nur die beiden äußeren Schichten waren quervernetzt, so dass während der Herstellung kein direkter Kontakt zwischen den Kationen und EDTA bestand.

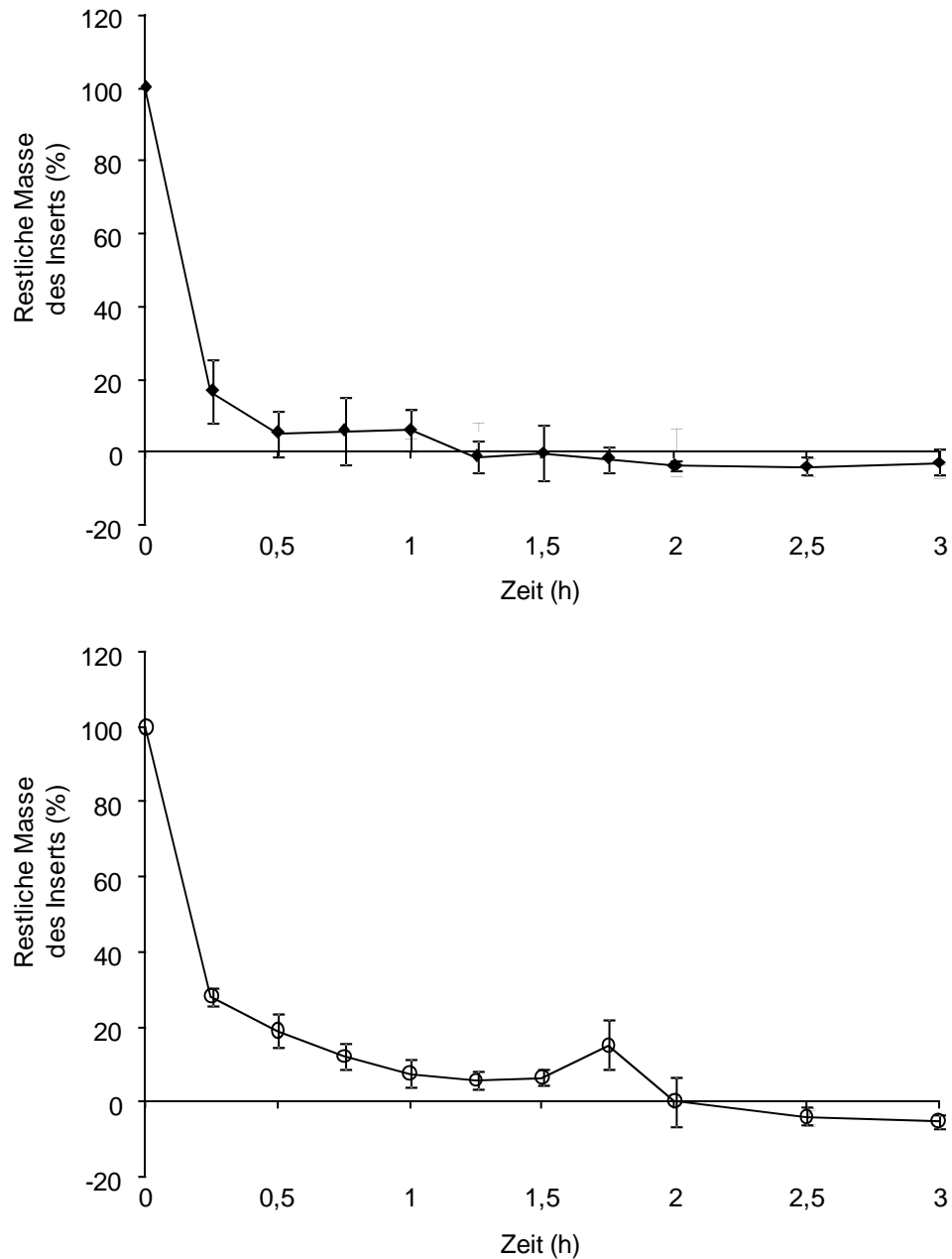


Abb. 30: Auflösung von Alginatinserten, deren Matrix gelöstes $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ enthält.

- $\text{CaHPO}_4:\text{Na}_2\text{-EDTA} = 1:1$
- $\text{CaHPO}_4:\text{Na}_2\text{-EDTA} = 1:0,5$

Wie Abb. 30 zeigt, lösten sich diese Inserte in vitro jedoch relativ schnell auf. Bei äquimolarem Verhältnis von CaHPO_4 und $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (oberer Graph) dauerte es nur etwa eine Stunde, bis sie komplett gelöst waren. Etwa 80% der Matrix lösten sich schon innerhalb der ersten 15 min auf. Durch eine Halbierung der $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Menge konnte die Auflösung nur leicht verzögert werden (Abb. 30, unterer Graph). In den ersten 15 min gingen 70% der Matrix in Lösung, vollständig aufgelöst war sie nach etwa zwei Stunden.

Die in beiden Fällen beobachtete schnelle Abnahme der Masse zu Beginn der Inkubation lässt vermuten, dass sich die mittlere, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -enthaltende Schicht der Inserte trotz der sie umgebenden quervernetzten Alginatschichten sehr schnell aufgelöst hat. Tatsächlich konnte während der Versuche bei einigen Proben beobachtet werden, dass sie sich entlang ihrer Längsachse teilten. Der schnelle Verlust eines Drittels der Masse kann also durch die nicht-quervernetzte mittlere Schicht erklärt werden. Da sich mit 70-80% aber ein weit größerer Teil der Matrix innerhalb von nur 15 min im Puffer auflöste, liegt es nahe, dass ein Teil des Calciums doch schon während der Herstellung durch EDTA komplexiert wurde. Die Alginatmatrix wurde also nicht mehr vollständig quervernetzt, so dass sich ein größerer Anteil schnell auflösen konnte. Die Herstellung der Inserte erfolgte in Teflonschalen, wobei die zweite, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -haltige Alginatlösung auf die erste, bereits quervernetzte und getrocknete Schicht gegossen wurde. Während der darauf folgenden Trocknungsphase könnte diese also wieder quellen und gelöstes $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ aus der Alginatlösung durch Diffusion in die gequollene erste Schicht übertreten, um hier Ca^{2+} zu komplexieren. Nachdem die zweite Schicht getrocknet war, wurde die oberste Schicht darauf gegossen und quervernetzt. Da die innere Gelierung bei Raumtemperatur relativ lange dauert, könnte sich die zweite Alginatschicht in der dritten zum Teil lösen, so lange diese noch flüssig ist. Demnach kann eine verfrühte Komplexbildung zwischen Ca^{2+} und EDTA durch den Schichtaufbau der Inserte nicht gänzlich vermieden werden. Dennoch bleiben genügend freie Ca^{2+} -Ionen in Lösung, so dass ein Teil der Alginatmatrix noch quervernetzt werden kann und sich somit nicht sofort im Puffer löst. Dabei dürfte auch die pH-abhängige Stabilität des Ca-EDTA-Komplexes eine Rolle spielen.

Es ist also möglich, durch die Einarbeitung von EDTA in Form ihres löslichen Dinatriumsalzes lösliche Augeninserte herzustellen. Durch den Komplexbildner kann die Quervernetzung später wieder rückgängig gemacht werden, damit sich das Augeninsert während der Anwendung in der Tränenflüssigkeit auflöst. Allerdings kann die Gelbildung in Gegenwart von $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ trotz der Trennung in mehreren Schichten nicht ausreichend kontrolliert wer-

den, was wahrscheinlich zu der beobachteten schnellen Auflösung in der Anfangsphase des Versuchs führt.

Wenn EDTA während der Quervernetzung mit den Polysaccharidketten um die freien Ca^{2+} -Ionen konkurriert, müssen die EDTA-Moleküle dem Gleichgewicht entzogen werden, um die Quervernetzung in Gegenwart des Komplexbildners zu ermöglichen. Das ist möglich durch die Verwendung von EDTA in Form der freien Säure ($\text{H}_4\text{-EDTA}$), die in Wasser schwer löslich ist und deswegen als Suspension verarbeitet werden kann [9]. Zur Insertherstellung wurde Alginat in einer Suspension von $\text{H}_4\text{-EDTA}$ in Wasser gelöst und anschließend quervernetzt. Die ausgestanzten Inserte wurden vor und nach der Inkubation gewogen und bei diesem Versuch zusätzlich noch fotografiert, um den Auflösungsprozess zu verdeutlichen.

$\text{H}_4\text{-EDTA}$ ist in reinem Wasser unlöslich, aber mit steigendem pH-Wert (z.B. durch Zugabe von NaOH) löst es sich unter Ausbildung des Dinatriumsalzes langsam auf [55]. Die Tränenflüssigkeit enthält mit 120-194 mmol deutlich mehr Natriumionen als andere Kationen, ihr pH-Wert liegt bei etwa 7,1-7,6 [56]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich $\text{H}_4\text{-EDTA}$ nach der Applikation langsam auflösen wird. Die Ionenstärke des für die in vitro Versuche verwendeten Puffers wurde nur mit NaCl eingestellt, weil die Literaturwerte zur Nachahmung der genauen Zusammensetzung der Tränenflüssigkeit zu ungenau sind. Wegen der geringen Flüssigkeitsmenge werden diese nur mit großer Streuung angegeben und erschwerend kommt noch hinzu, dass zur Bestimmung dieser Werte die Tränenproduktion angeregt wurde, wodurch sich allerdings deren Zusammensetzung ändert [29].

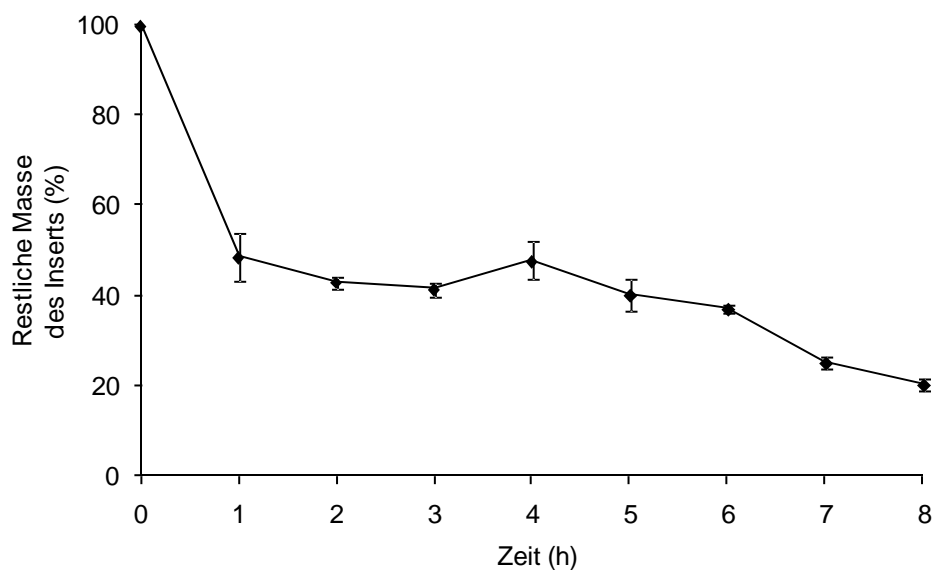


Abb. 31: Auflösung von Alginatinserten, in deren Matrix unlösliche $\text{H}_4\text{-EDTA}$ als Suspension inkorporiert wurde.

Wie in Abb. 31 zu sehen, lösten sich die Inserte mit H_4 -EDTA im Vergleich zu denen mit Na_2 -EDTA deutlich langsamer auf. Etwa die Hälfte der Matrix ging innerhalb einer Stunde in Lösung, danach blieb die Masse des Inserts während einer Phase von mehreren Stunden fast unverändert. Erst nach sechs Stunden Inkubation löste sich der Rest langsam weiter auf und nach acht Stunden, am Versuchsende, konnten noch 20% der Insertmasse gewogen werden. Tatsächlich waren die Inserte allerdings nach acht Stunden komplett aufgelöst und das Glas war nach dem Waschen leer, wie die letzte Fotografie in Abb. 32 zeigt. Die anderen Bilder der Fotostrecke zeigen den Rest des Inserts nach der jeweiligen Inkubationsdauer. Man erkennt deutlich, dass das Insert zwei Stunden lang seine runde Form beibehält. Erst danach wird der Auflösungsprozess der Alginatmatrix auch an deren Form erkennbar, wobei die beobachtete Verkleinerung der Matrix im Vergleich mit der Abnahme der gewogenen Masse eher kontinuierlich verläuft. Da die Inserte direkt nach Entfernung des Inkubationsmediums mit Wasser gewaschen wurden, kann diese Diskrepanz nicht durch zurückbleibende Puffersalze erklärt werden. Außerdem waren nach der Trocknung keinerlei Rückstände im Glas zu sehen. Allerdings bilden Alginatlösungen beim Trocknen dünne Filme [34], die mit dem Auge nicht zu erkennen sind. Der Unterschied ist also am ehesten auf beim Waschen zurückgebliebene Alginatreste zurück zu führen, die wegen ihrer geringen Dicke nach der Trocknung im Glas nicht zu erkennen sind. Sie erhöhen aber die Masse des leeren Glases und täuschen somit einen nicht mehr vorhandenen Rest des Inserts vor.

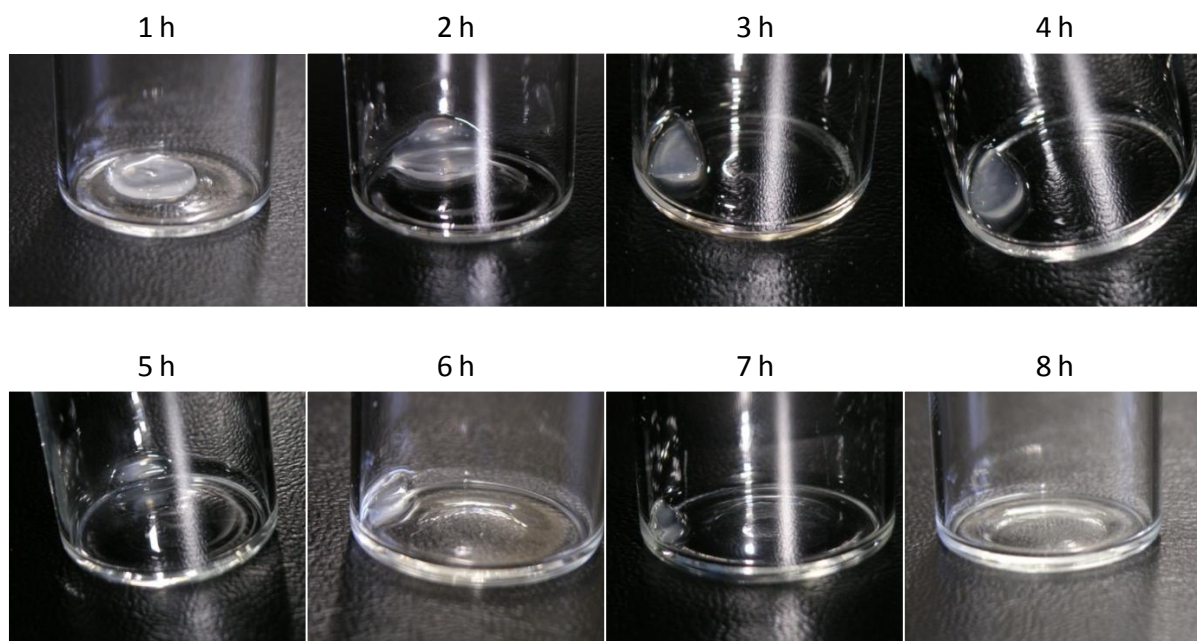


Abb. 32: Ungelöste, noch feuchte Reste von Alginatinsernten mit H_4 -EDTA. Die Fotos wurden jeweils zum angegebenen Zeitpunkt nach dem Waschschrift aufgenommen.

Durch eine Wägung des verbleibenden Rests kann die Erosion also nicht verlässlich dargestellt werden. Deswegen musste eine Methode gefunden und etabliert werden, mit der das zu einem bestimmten Zeitpunkt in Lösung gegangene Alginat direkt quantifiziert werden kann. Mit einem solchen Nachweis kann die Erosion der Inserte genauer und zuverlässiger beschrieben werden.

2.3 Löslichkeit der mit $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ quervernetzten Augeninserte

Die innere Quervernetzung von Alginat mit der $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Methode (s. Kapitel 3 und 4) stellt eine weitere Möglichkeit dar, den Komplexbildner in die Matrix zu inkorporieren. Diese hat den Vorteil, dass alle Bestandteile gelöst vorliegen und somit eine einfache Sterilfiltration möglich ist, so dass damit relativ leicht sterile Augeninserte nach den Anforderungen des Arzneibuchs hergestellt werden können. Die Erosion dieser Inserte sollte möglichst zuverlässig bestimmt werden, um eine bessere Ausgangslage für eine eventuelle klinische Prüfung der Augeninserte zu haben. Daher erfolgte hier die Quantifizierung des gelösten Alginats anstelle des verbleibenden Restes.

Die Inserte wurden wieder aus getrockneten und quervernetzten Alginatfilmen ausgestanzt und in Tris-Puffer bei 37°C inkubiert. Zu vorher festgelegten Zeitpunkten wurden Proben gezogen und durch neuen Puffer ergänzt. Die Alginatkonzentration darin wurde mit Hilfe des Borat-Carbazol-Nachweises kolorimetrisch bestimmt.

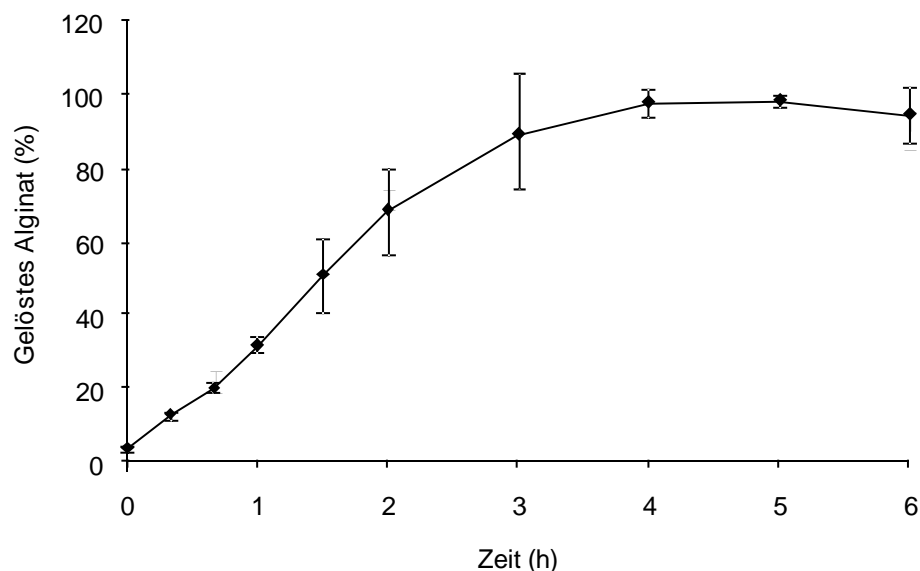
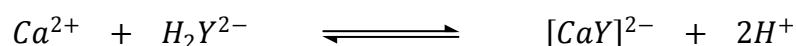


Abb. 33: Auflösung von Alginatinserten, die mittels $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ hergestellt wurden. Gemessen wurde die zum jeweiligen Zeitpunkt gelöste Alginat-Menge.

Wie in Abb. 33 zu erkennen ist, lösten sich auch diese Inserte in Tris-Puffer bei pH 7,4 auf. Schon nach drei Stunden waren sie vollständig in Lösung gegangen, aber die Auflösung erfolgte hier deutlich gleichmäßiger als die der oben beschriebenen Inserte. Während der Inkubation quillt die Matrix und wird komplett vom Puffer durchdrungen. Dabei werden die aus der bei der Quervernetzung entstandenen Gluconsäure stammenden Protonen abgepuffert, so dass sich das Gleichgewicht der folgenden Dissoziation nach rechts, also auf die Seite des stabilen Chelatkomplexes, verschiebt (zur Vereinfachung steht hier wiederum „Y“ anstelle des EDTA-Moleküls):



Dadurch wird das Ca^{2+} aus der Komplexbildung durch das Alginat gelöst und die Quervernetzung somit rückgängig gemacht. Das Abfangen der Protonen durch den Puffer ist hier also für die Auflösung der Alginatmatrix besonders wichtig, da ansonsten die Stabilität des Ca-EDTA-Komplexes nicht für eine vollständige Bindung der Ca^{2+} -Ionen ausreicht.

Während der Applikation sollten sich die Inserte möglichst kontrolliert auflösen. Daher wurde versucht, die Auflösungsgeschwindigkeit zu beeinflussen, indem die zur Quervernetzung verwendete Menge Glucono- δ -lacton variiert wurde. Dabei zeigten sich nur sehr geringe Unterschiede, die Inserte lösten sich alle innerhalb von zwei bis vier Stunden auf. Abb. 34 zeigt die Auflösungsprofile der mit vier unterschiedlichen GDL-Konzentrationen hergestellten Augeninserte. Die grau hinterlegten Kurvenabschnitte kennzeichnen jeweils die Bereiche, in denen sich die Alginatkonzentrationen an zwei aufeinander folgenden Zeitpunkten nicht mehr signifikant voneinander unterschieden. Demnach waren Inserte, die mit nur 0,6% GDL quervernetzt wurden, nach nur zwei Stunden komplett gelöst, solche mit 0,8% und 1% nach drei Stunden und diejenigen mit 1,5% erst nach vier Stunden.

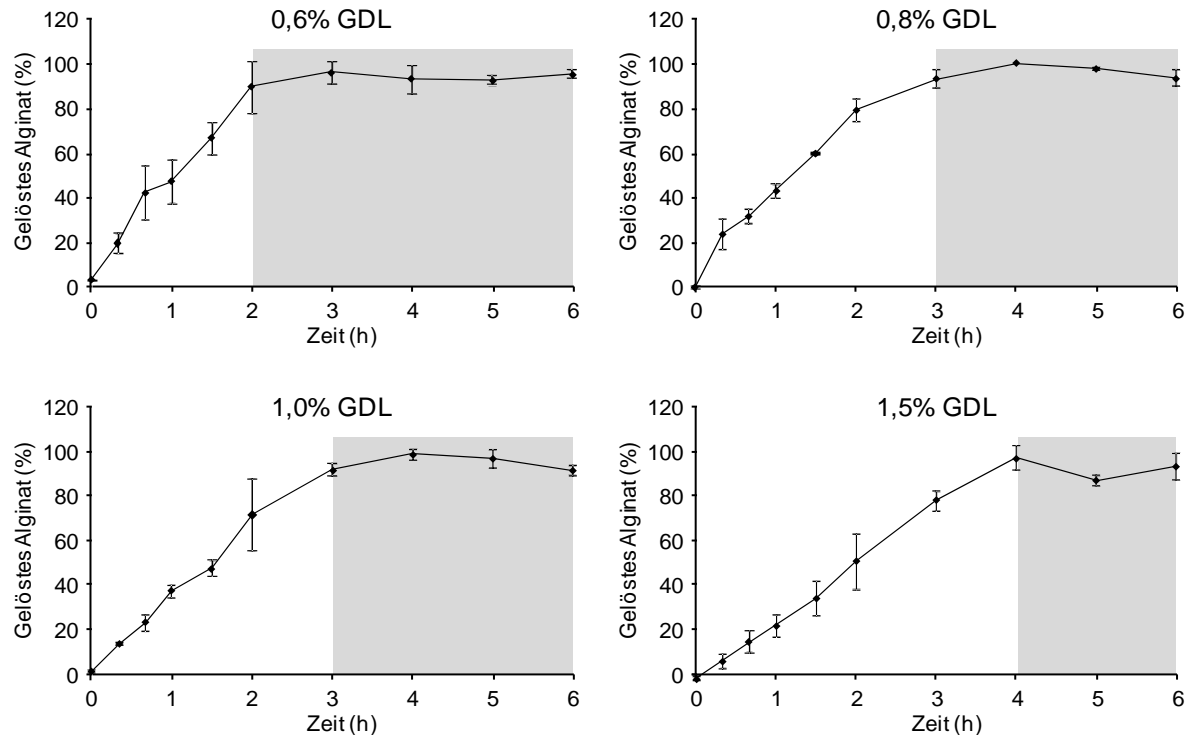


Abb. 34: Auflösung von Alginatinserten in Abhängigkeit von der zur Quervernetzung verwendeten GDL-Konzentration.

Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist die bessere Quervernetzung der Alginatgele mit höherem GDL-Anteil. Je mehr Ca^{2+} -Ionen die Alginatketten miteinander verbinden, desto länger dauert die Auflösung der Matrix. Wie in Kapitel 4/Kapitel 3, Abschnitt 2.2.2 gezeigt wurde, nimmt die Gelstärke mit zunehmender GDL-Konzentration zu. In Übereinstimmung damit zeigte sich hier eine längere Auflösungsdauer der Inserte mit höherem GDL-Gehalt. Die Gelstärke nahm, im Gegensatz zur Auflösungsdauer, auch noch zwischen 0,8% und 1% GDL zu. Allerdings war der Unterschied weniger stark als zwischen 0,6% und 0,8% bzw. 1% und 1,5% GDL-Gehalt. Um diesen geringen Unterschied auch bei der Auflösung zu erkennen, müssten die Zeitpunkte der Probennahme wohl deutlich enger gewählt werden.

3. Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass eine mittels Ca^{2+} -Ionen quervernetzte Alginatmatrix durch Zugabe von EDTA als Chelatbildner in das umgebende Medium wieder aufgelöst werden kann. Wenn EDTA direkt in die Matrix inkorporiert wurde, lösten sich die Inserte auch in EDTA-freiem Puffer auf. Zur Inkorporation des Chelatbildners sollte dieser entweder als Suspension in Form der freien Säure verarbeitet werden, oder als gelöster Ca^{2+} -Komplex, der

je nach pH-Wert unterschiedlich stark dissoziiert. Dabei wird die zweite Methode wegen der leichter durchzuführenden Sterilisierung bevorzugt. Durch die Menge des bei der Herstellung verwendeten Glucono- δ -lactons kann die Dauer der Auflösung in engen Grenzen kontrolliert werden. Eine klinische Studie zur Überprüfung der in vivo Auflösung der mit $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ hergestellten Inserte ist geplant. Gleichzeitig soll damit auch deren Verträglichkeit am menschlichen Auge getestet werden.

Kapitel 6

Beladung von Alginat-Augeninserten mit EGF

1. Einleitung

Wachstumsfaktoren sind lösliche Proteine, die durch Bindung an spezifische Rezeptoren sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung von Zellen fördern [117]. Dazu gehören unter anderem EGF und NGF, für deren Entdeckung Stanley Cohen und Rita Levi-Montalcini 1986 den Nobelpreis für Medizin verliehen bekamen [103]. Cohen isolierte zu Beginn der 1960er Jahre erstmals EGF aus der Speicheldrüse von Mäusen [129]. Humanes EGF wurde dann erstmals 1975 aus Urin gewonnen, ebenfalls von Cohen. Es zeigte sich, dass die Aminosäuresequenzen der beiden Formen zwar nicht identisch sind, aber doch große Ähnlichkeiten aufweisen. Außerdem haben beide Peptide ähnliche biologische Wirkungen und beide wirken sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen [22].

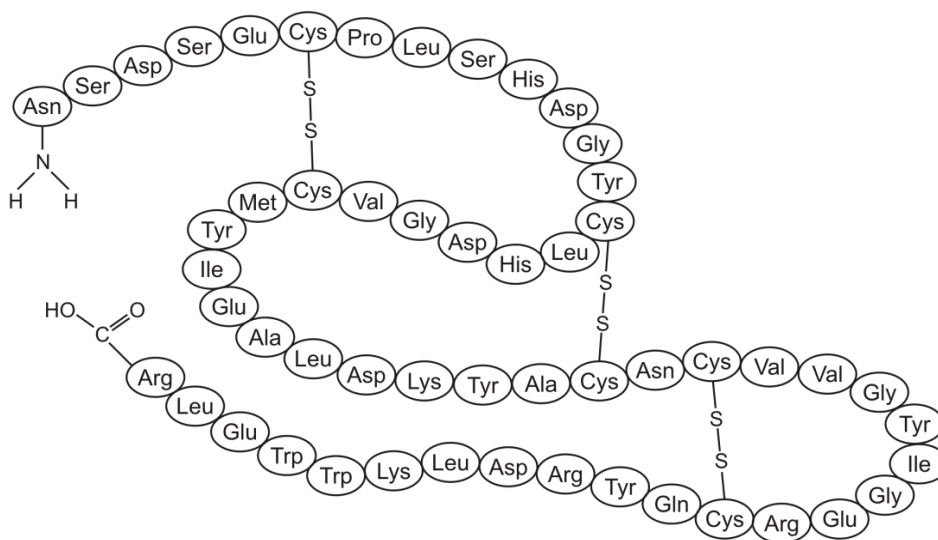


Abb. 35: Aminosäuresequenz von humanem EGF mit 53 Aminosäuren. Eingezeichnet sind auch die drei für die Wirkung essentiellen Disulfidbrückenbindungen [38].

Menschliches EGF ist ein aus 53 Aminosäuren aufgebautes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 6216,05 Da. Seine Aminosäuresequenz und die Lage der drei für die Wirkung erforderlichen Disulfidbrücken sind in Abb. 35 dargestellt. Die Sekundärstruktur des Moleküls zeigt keine α -Helix, aber etwa 25% β -Faltblattstrukturen [21]. Zusammen mit den Disulfidbrücken verleihen diese dem Peptid eine kompakte und globuläre Struktur [20].

EGF wird von der Zelle als sogenanntes präpro-EGF synthetisiert [21]. Dieses Vorläuferprotein ist mit etwa 1200 Aminosäuren und ca. 170 kDa deutlich größer als der Wachstumsfaktor und liegt als glykosyliertes, membranständiges Protein vor [97]. Durch proteolytische Spaltung nahe der Zelloberfläche wird aus präpro-EGF das lösliche pro-EGF freigesetzt (ca. 150 kDa), das durch weitere Abspaltung zu fertigem EGF (ca. 6 kDa) umgewandelt wird. Alle

drei Formen des Wachstumsfaktors sind biologisch aktiv. Während das membranständige Vorläuferprotein durch juxtakrine Stimulation nur auf Zellen einwirken kann, die in unmittelbarem Kontakt zur produzierenden Zelle stehen, können die löslichen Proteine durch einen parakrinen Mechanismus auch weiter entfernte Zellen stimulieren [25].

Die bekannteste Wirkung von EGF auf epidermale und epitheliale Zellen ist die Anregung zur Proliferation [20]. Daneben beeinflusst EGF aber auch die Differenzierung und Migration von Zellen sowie deren Proteinsekretion [142] und reguliert somit die Entwicklung des Organismus, das Wachstum und die Erneuerung von Geweben und die Wundheilung [25]. Ausgelöst wird die Wirkung durch die Bindung des Wachstumsfaktors an den EGF-Rezeptor auf der Zielzelle. Dieser besteht aus einer einzigen Aminosäurekette mit drei Domänen: eine extrazelluläre, um den Liganden zu binden, eine hydrophobe, die den Rezeptor in der Membran verankert und eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität, die für die Signalweiterleitung von Bedeutung ist [21]. Bindet EGF an die extrazelluläre Domäne, kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors, wodurch die Tyrosinkinase im Zellinneren aktiviert wird und bestimmte Tyrosinreste der intrazellulären Domäne phosphoryliert. Diese phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Bindungsstellen für weitere Moleküle, die dann selbst aktiviert werden und verschiedene intrazelluläre Signalwege auslösen.

Es gibt drei Hauptwege, die durch den EGF-Rezeptor aktiviert werden (s. Abb. 36): der Ras/Raf/MAPK-Weg, der PLC γ -Weg und der PI₃-K-Weg [90]. Der Ras/Raf/MAPK-Weg beginnt mit der Bindung des Adapterproteins Shc an die Phosphotyrosinreste des aktivierten EGF-Rezeptors. Über zwei weitere Adaptermoleküle (GRB2 und SOS) wird das in der Zellmembran verankerte kleine G-Protein Ras durch den Austausch von GDP mit GTP aktiviert. Dieses aktivierte Protein setzt eine Reihe von Phosphorylierungsreaktionen in Gang: Zunächst wird die Serin/Threonin-Kinase Raf aktiviert, die als zweite Stufe die MAPK-Kinase (MAPKK) phosphoryliert. Durch diese wird im letzten Schritt der Kaskade die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) aktiviert. Diese wandert in den Zellkern, um hier Transkriptionsfaktoren zu aktivieren und dadurch die Genexpression zu stimulieren [90]. Die vermehrte Genexpression führt dann zur erhöhten Zellproliferation, aber auch zu einer verstärkten Differenzierung der Zellen [25].

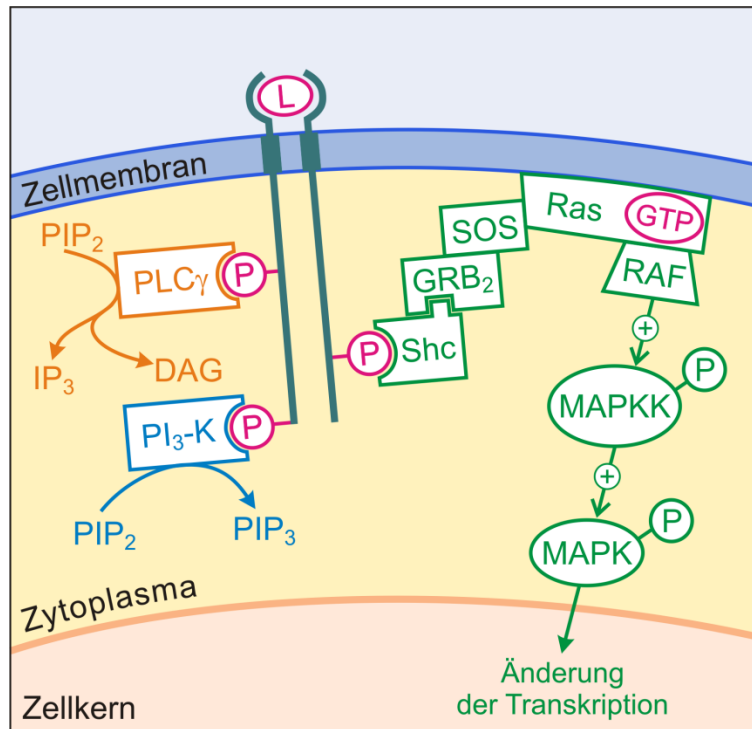


Abb. 36: Signaltransduktion am EGF-Rezeptor (nach [89]):

Die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zu dessen Dimerisierung und Autophosphorylierung. Daraufhin können drei intrazelluläre Signalwege aktiviert werden: Ras/Raf/MAPK-Weg (grün), PLCγ-Weg (orange) und PI₃-K-Weg (blau).

Die Phospholipase C_γ (PLC_γ) bindet direkt an die Phosphotyrosinreste des aktiven EGF-Rezeptors und wird dadurch aktiviert. Sie katalysiert die Spaltung von Phosphatidylinositol-2,4-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). Beide Moleküle wirken als *second messenger*, wobei IP₃ die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum bewirkt. Zusammen mit DAG aktiviert Ca²⁺ dann die Proteinkinase C, die durch die Regulation von Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle bei Wachstum und Differenzierung von Zellen spielt [90]. Außerdem führt der PLC_γ-Signalweg durch die Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Gehalts zu einer erhöhten Motilität der Zellen. Daran beteiligt ist auch die Mobilisation von Aktin-modifizierenden Proteinen [142].

Die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI₃-K) ist eine Lipidkinase, die ebenfalls ohne Adaptermoleküle direkt durch die Bindung an einen Phosphotyrosin-Rest des EGF-Rezeptors aktiviert wird. Sie katalysiert die Umwandlung von PIP₂ zu PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat), das dann mit Proteinkinasen interagiert, welche verschiedene zelluläre Reaktionen beeinflussen. Dazu gehören zum Beispiel das Überleben der Zelle, das Zellwachstum oder die Neuordnung von Aktin innerhalb der Zelle [25].

Am Auge finden sich EGF-Rezeptoren unter anderem im Epithel der Hornhaut, vor allem im Bereich des Limbus [57], und am Epithel der Bindehaut [88]. In beiden Fällen ist die größte Rezeptorendichte auf den Basalzellen des Epithels zu finden, die ein größeres proliferatives Potential besitzen, während die Rezeptorendichte auf den oberflächlichen Zellen geringer ist. EGF wirkt also auf der Augenoberfläche, wobei die langfristigen Effekte des Wachstumsfaktors gut durch den oben beschriebenen Wirkmechanismus beschrieben werden können. Zum Beispiel fördert EGF die Wundheilung des Hornhautepithels, was durch die angeregte Proliferation und Migration der Basalzellen erklärt werden kann [53].

EGF ist, neben anderen Wachstumsfaktoren, auch in der normalen Tränenflüssigkeit enthalten und wird von der Tränendrüse sezerniert [61]. Wahrscheinlich dient das Zytokin der Aufrechterhaltung der Homöostase der Augenoberfläche, indem es zum Beispiel die Sekretion von Muzin aus den Becherzellen der Bindehaut reguliert [67]. In der Tränenflüssigkeit von Patienten mit Keratoconjunctivitis sicca konnte ein geringerer EGF-Gehalt nachgewiesen werden [105; 110]. Weil Muzin für die Benetzung der Augenoberfläche durch den Tränenfilm von Bedeutung ist, könnte also eine direkte Behandlung der Epithelien mit EGF für die Patienten von Vorteil sein [80; 136].

EGF kommt in verschiedenen Tierarten (darunter Vögel und Säuger) vor und wird dementsprechend auch, als rekombinant hergestelltes EGF, in unterschiedlichen Formen angeboten. Obwohl zum Beispiel EGF von der Maus auch am Menschen wirkt und umgekehrt [129], ist für die Anwendung am Menschen humanes EGF sicherlich am besten geeignet. Von den zahlreichen auf dem Markt erhältlichen Produkten ist jedoch nur eines auch zur Verwendung am Menschen zugelassen, was Voraussetzung für die Benutzung des Peptids als Arzneistoff ist. Folglich sollte dieses Produkt zur Beladung der Augeninserte mit EGF eingesetzt werden. Da für die Herstellung von Arzneimitteln sowohl Reinheit als auch Identität der eingesetzten Stoffe von Bedeutung sind, wurden damit entsprechende Untersuchungen mit HPLC und Massenspektrometrie durchgeführt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Herstellung von Arzneimitteln ist die Stabilität des Wirkstoffs. Gerade Peptide sind im Allgemeinen instabil und chemische Veränderungen an einem oder mehreren Aminosäureresten können schnell zum Aktivitätsverlust führen. Da der Wachstumsfaktor während der Herstellung von Augeninserten in gelöster Form vorliegt, kann es leicht zu Abbaureaktionen kommen, zumal die Trocknungszeit mit 48 h sehr lange dauert. Um den Abbau von EGF während der Insertherstellung zu untersuchen, wurden die fertigen Inserte aufgelöst und die in dieser Lösung vorhandenen Peptide chromatographisch aufgetrennt. Die Identifizierung der Abbauprodukte erfolgte mittels Massenspektroskopie.

Damit während der Anwendung von mit EGF beladenen Augeninserten der Wachstumsfaktor seine Wirkung entfalten kann, muss er aus der Arzneiform heraus zu seinem Wirkort diffundieren. Die Freisetzungseigenschaften der Augeninserte sind also für den Erfolg einer Therapie mit EGF von entscheidender Bedeutung. Zu deren Optimierung wurden in vitro Untersuchungen zunächst mit einem relativ einfachen Versuchsaufbau durchgeführt, indem die Inserte in 5 ml Puffer inkubiert wurden. Dabei wurde die Zusammensetzung der Alginatmatrix geändert: Zum einen wurde mehr Alginat zur Herstellung verwendet und zum anderen wurden die Monomerenzusammensetzung sowie die Kettenlänge des verwendeten Alginats variiert. Um die in vitro-Freisetzung besser den physiologischen Verhältnissen anzupassen, wurden die Inserte auch in einer Durchflusszelle mit geringem Volumen und kleinem Fluss getestet.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Untersuchungen zur Reinheit und Identität von EGF

Die Beladung der Augeninserte sollte mit rekombinant hergestelltem EGF erfolgen, das zur Anwendung am Menschen zugelassen ist. Da in Deutschland kein entsprechendes Produkt erhältlich ist, wurde EGF vom „Center for Genetic Engineering and Biotechnology“ in Havana (Kuba) gekauft. Bevor das Peptid verwendet wurde, sollte dessen Reinheit und Identität durch einen Vergleich mit reinem, nur zu Forschungszwecken und zum Gebrauch in Laboratorien zugelassenem EGF bestätigt werden. Das Vergleichspeptid wurde von der Biomol GmbH in Hamburg gekauft. Die beiden verwendeten EGF-Sorten werden im Folgenden als „EGF in GMP-Qualität“ und „EGF in Labor-Qualität“ bezeichnet.

Zunächst wurde von beiden Peptiden das Molekulargewicht mittels MALDI-ToF bestimmt. Anhand seiner Aminosäurezusammensetzung [133] wurde das Molekulargewicht von humanem EGF berechnet (6216,05 Da) und mit dem experimentell ermittelten Wert verglichen. Das Massenspektrum der Vergleichssubstanz (EGF in Labor-Qualität) zeigte nur eine Substanz mit einem Molekulargewicht von 6218,3 Da (vgl. Abb. 37, oben). Der zweite Peak bei einem Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) von 3108,7 stammt von einem doppelt geladenen Molekül, daraus ergibt sich folglich ein Molekulargewicht von 6217,4 Da. Das Ergebnis liegt also leicht über dem theoretisch zu erwartenden Molekulargewicht, allerdings kann man unter Berücksichtigung der Ungenauigkeit von MALDI-ToF Messungen (etwa 0,1% [40]) davon ausgehen, dass die Aminosäurezusammensetzung dieser Probe korrekt ist und das Peptid alle 53 Aminosäuren enthält. Da keine weiteren Signale detektiert wurden, kann auch eine ausreichende Reinheit angenommen werden.

Die Reinheit der zweiten Probe (EGF in GMP-Qualität) dagegen war deutlich schlechter. Neben den von doppelt geladenen Molekülen herrührenden Signalen bei Masse/Ladungs-quotienten von etwa 3000 konnten drei einfach geladene Peptide mit Molekulargewichten von 6054,0 Da, 5940,8 Da und 5626,8 Da detektiert werden (vgl. Abb. 37, unten). Keiner dieser Messwerte entspricht dem berechneten Molekulargewicht, die Peptide in dieser Probe scheinen demnach anders zusammengesetzt zu sein als humanes EGF.

Den Hinweis auf die tatsächliche Zusammensetzung gab eine Studie zur Wirksamkeit von EGF mit verkürzter Aminosäurekette, die unter Beteiligung des kubanischen Herstellers im Jahr 2000 veröffentlicht wurde. Die Autoren verglichen natürliches EGF mit Varianten, deren Peptidkette vom C-Terminus her um eine bzw. zwei Aminosäuren verkürzt waren [19]. Daher wurden, ausgehend von der bekannten Primärstruktur von humanem EGF, die Molekular-

gewichte einer Reihe von jeweils um eine Aminosäure verkürzten EGF-Varianten berechnet. Es zeigte sich, dass in dem GMP-konformen Produkt mit hoher Wahrscheinlichkeit folgende verkürzte EGF-Varianten enthalten sind (die Zahlen in Klammern geben das jeweils berechnete Molekulargewicht an): EGF₁₋₅₂ (6059,8 Da), EGF₁₋₅₁ (5946,7 Da) und EGF₁₋₄₉ (5631,3 Da).

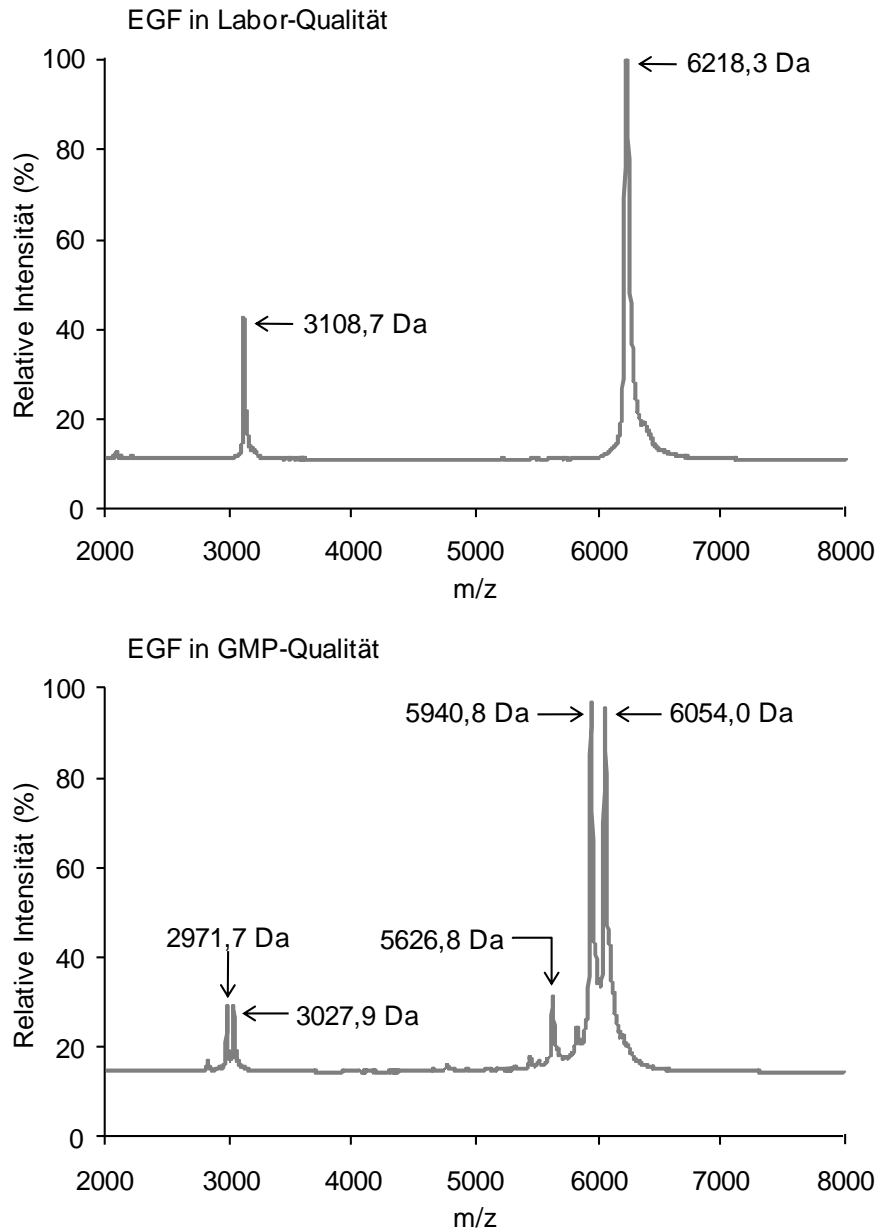


Abb. 37: Massenspektren der beiden EGF-Sorten (Labor- und GMP-Qualität), aufgenommen mittels MALDI-ToF.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren und um die Reinheit der Substanz mit einer zweiten Methode beurteilen zu können, wurden die beiden Peptide mittels LC/MS analysiert. Dazu wurden die Proben zunächst an einer C18-Säule chromatographisch getrennt und anschlie-

ßend von den detektierten Bestandteilen ein Massenspektrum aufgenommen. Dabei bestätigte sich die gute Reinheit der Vergleichssubstanz, wie am UV-Chromatogramm zu sehen ist (Abb. 38). Neben dem Hauptpeak nach einer Retentionszeit von 28,29 min zeigte sich nur ein weiteres, deutlich kleineres Signal nach einer Retentionszeit von 27,44 min.

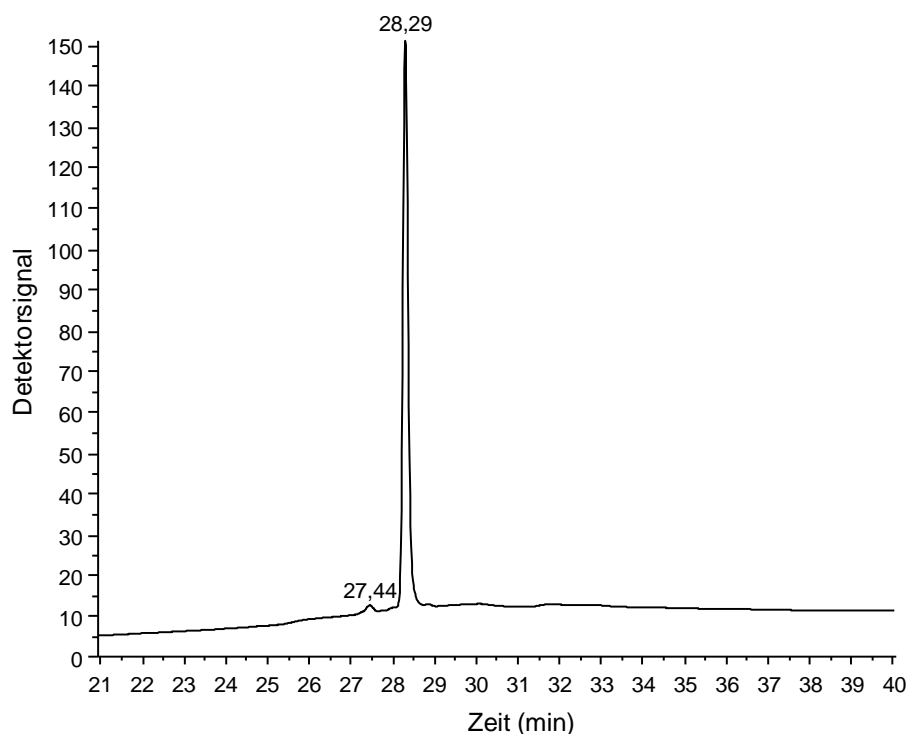


Abb. 38: Chromatogramm von EGF in Labor-Qualität (UV-Detektor, $\lambda = 220$ nm).

Das Massenspektrum des Hauptpeaks, der nach 28,29 min eluiert wurde, ist in Abb. 39 wiedergegeben. Es zeigt mehrere Signale, von denen das bei einem Massen/Ladungs-Quotienten von 1555,1 deutlich als Hauptsignal zu erkennen ist. Die Heterogenität des Spektrums ist in diesem Fall nicht auf verschiedene Bestandteile der Probe zurück zu führen, sondern auf das zur Ionisierung des Analyten verwendete Verfahren. Bei der „*electrospray ionisation*“ (ESI, Ionisation durch Versprühen einer Lösung in einem elektrischen Feld) bilden sich sogenannte Quasimolekülonen der allgemeinen Form $[M + H]^+$, die häufig mehrfach geladen sind [40]. Gleiche Moleküle mit verschiedenen Ladungen führen zu unterschiedlichen Signalen im Massenspektrum und das jeweilige Molekulargewicht muss aus dem Massen/Ladungs-Quotienten (m/z) berechnet werden. In Abb. 39 sind die Signale dreier Quasimolekülonen zu erkennen, die drei-, vier- bzw. fünffach geladen sind. Daraus ergibt sich jeweils ein Molekulargewicht von 6215,5 Da, 6216,4 Da und 6215,4 Da. Diese Signale können also alle dem vollständigen Peptid EGF₁₋₅₃ zugeordnet werden. Die kleineren Peaks

jeweils rechts vom vierfach und dreifach geladenen EGF entstehen durch Anlagerungen von Trifluoressigsäure (TFA, engl. „*Trifluoroacetic acid*“) aus der mobilen Phase der HPLC. Dieses Ionenpaarreagenz hat ein Molekulargewicht von 114,02 Da und ergibt bei vierfacher Ladung eine Differenz von etwa 28,5 Da zwischen den einzelnen Signalen, bei dreifacher Ladung eine von etwa 38 Da.

Von dem kleineren Signal, das im Chromatogramm nach einer Retentionszeit von 27,44 min zu erkennen ist, konnte leider kein Massenspektrum aufgenommen werden, da wegen der geringen Menge das Signal-Rausch-Verhältnis zu gering war. Jedoch kann angenommen werden, dass dieses Signal von oxidiertem EGF hervorgerufen wurde, da oxidiertes EGF kurz vor dem unveränderten Peptid eluiert wird [69].

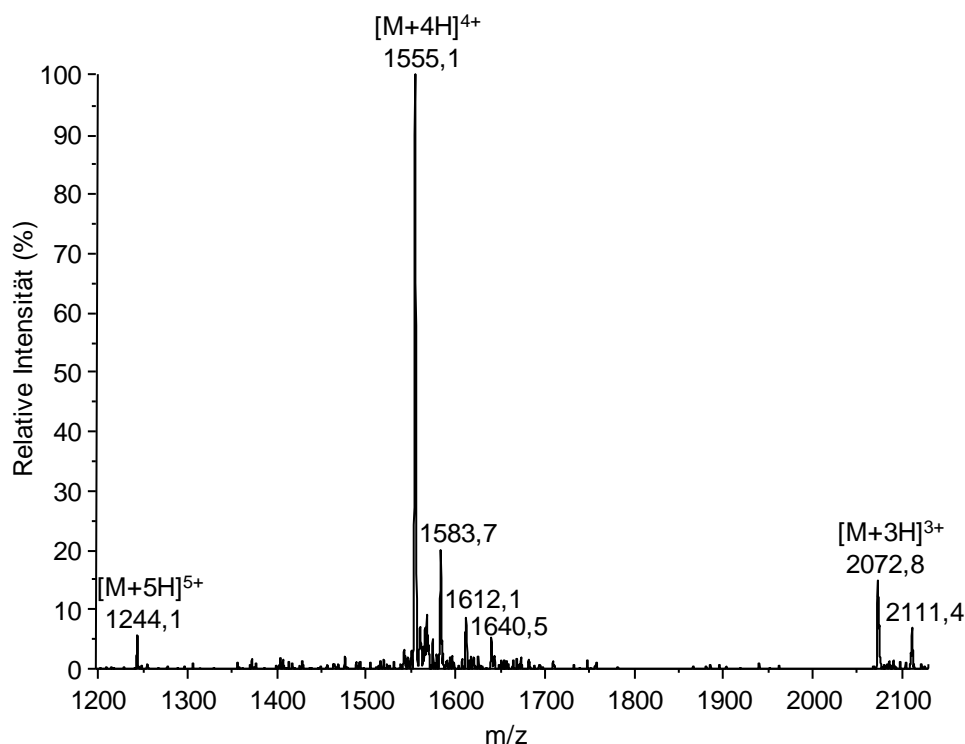


Abb. 39: Massenspektrum des zweiten Peaks aus Abb. 38 (Retentionszeit 28,29 min), aufgenommen mittels ESI-MS.

Abb. 40 zeigt das Chromatogramm der zweiten Probe (EGF in GMP-Qualität). Hier sind insgesamt sechs Peaks zu erkennen, die alle auch ein auswertbares Massenspektrum ergaben. Anstelle der einzelnen Spektren sind die relevanten Ergebnisse in Tab. 19 zusammengefasst. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden dabei die TFA-Addukte nicht berücksichtigt und nur die drei- bzw. vierfach geladenen Quasimolekülonen ausgewertet.

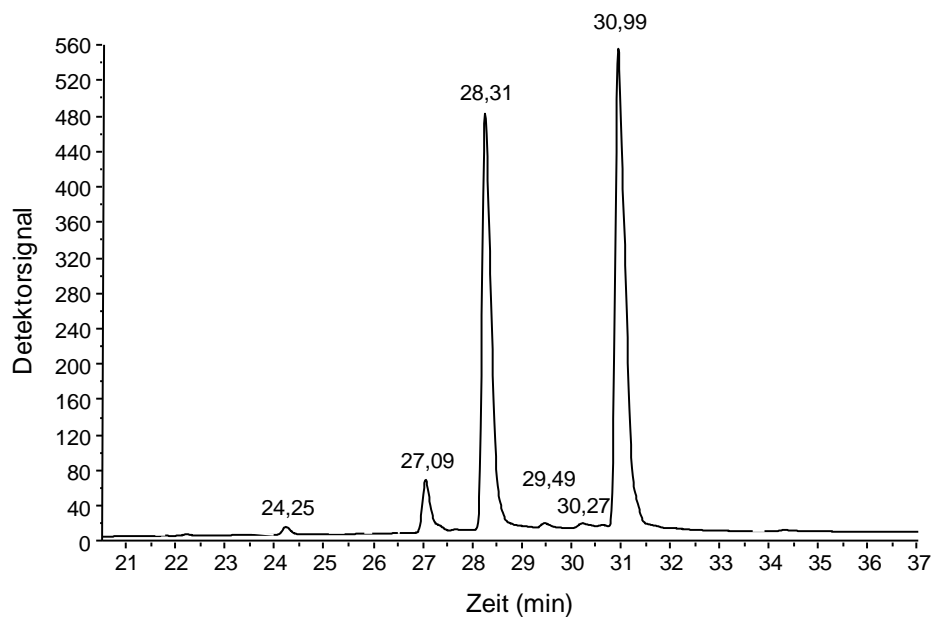


Abb. 40: Chromatogramm von EGF in GMP-Qualität (UV-Detektor, $\lambda = 220$ nm).

Retentionszeit (min)	m/z	Ladung	Molekulargewicht (Da)	Zuordnung
24,25	1362,3	$[M + 4H]^{4+}$	5445,2	EGF ₁₋₄₈ (5445,2 Da)
	1816,1	$[M + 3H]^{3+}$	5445,3	
27,09	1409,0	$[M + 4H]^{4+}$	5632,0	EGF ₁₋₄₉ (5621,4 Da)
	1878,2	$[M + 3H]^{3+}$	5631,6	
28,31	1487,8	$[M + 4H]^{4+}$	5947,2	EGF ₁₋₅₁ (5946,7 Da)
	1983,5	$[M + 3H]^{3+}$	5947,5	
29,49	1455,6	$[M + 4H]^{4+}$	5818,4	EGF ₁₋₅₀ (5817,6 Da)
	1940,4	$[M + 3H]^{3+}$	5818,2	
30,27	1520,1	$[M + 4H]^{4+}$	6076,4	ox-EGF ₁₋₅₂ (6075,9 Da)
	2026,3	$[M + 3H]^{3+}$	6075,9	
30,99	1516,2	$[M + 4H]^{4+}$	6060,8	EGF ₁₋₅₂ (6059,9 Da)
	2021,3	$[M + 3H]^{3+}$	6060,9	

Tab. 19: Ergebnisse der LC/MS-Untersuchung des GMP-konformen EGFs
(die eingeklammerte Zahl in der Spalte „Zuordnung“ ist das aus der jeweiligen Aminosäuresequenz berechnete theoretische Molekulargewicht der EGF-Variante).

Es zeigte sich, dass in der zur Anwendung am Menschen zugelassenen EGF-Lösung insgesamt fünf verschiedene EGF-Sorten mit 48 bis 52 Aminosäureresten enthalten sind. Dabei fehlten die entsprechenden Aminosäuren immer am C-terminalen Ende der Aminosäurekette. Das HPLC-Signal mit einer Retentionszeit von 30,27 min konnte anhand seines Massenspektrums als oxidierte Form von EGF₁₋₅₂ identifiziert werden.

Der Wirkstoff in GMP-Qualität ist also ein Gemisch verschiedener EGF-Varianten, die jeweils vom C-terminalen Ende her um bis zu fünf Aminosäuren verkürzt sind. Die einzelnen Peptide liegen dabei in sehr unterschiedlichen Mengen vor, was am Chromatogramm gut zu erkennen ist (Abb. 40). EGF₁₋₅₂ und EGF₁₋₅₁ bilden den Hauptanteil und zeigen die größten Signale im UV-Detektor. Calnan et al. verglichen die Aktivität dieser beiden EGF-Sorten mit der von vollständigem EGF₁₋₅₃ und konnten zeigen, dass kein Unterschied zwischen diesen Formen besteht [19]. Von den restlichen verkürzten Peptiden ist in der Literatur nur noch EGF₁₋₄₈ beschrieben, dessen Aktivität gegenüber EGF₁₋₅₃ um etwa 30% geringer ist [41]. Noch mehr nimmt die Aktivität ab, wenn die Aminosäure Leucin an Position 47 entfernt wird, die offensichtlich für die Rezeptorbindung von Bedeutung ist [43]. Da die Position 47 aber in allen nachgewiesenen Peptiden vorhanden ist und die stärker verkürzten Formen außerdem nur in geringer Menge vorhanden sind, kann auch die GMP-konforme EGF-Lösung als aktiv angesehen werden. Sie ist jedoch aufgrund ihrer Heterogenität nicht für Stabilitätsstudien geeignet.

2.2 Stabilität von EGF während der Herstellung von Augeninserten

2.2.1 Abhängigkeit der EGF-Stabilität von der verwendeten Quervernetzungsmethode

Der Einfluss der zwei grundsätzlich verschiedenen Quervernetzungsmethoden für Alginat-gele (äußere und innere Gelierung, s.a. Kapitel 3) auf die Stabilität von EGF wurde mit Hilfe der HPLC untersucht. Zur Herstellung der Alginatfilme mittels äußerer Gelierung wurde EGF in gelöster Form direkt zur Alginatlösung gegeben. Die Gelierung erfolgte durch Eintauchen der getrockneten Filme in eine CaCl₂-Lösung. Folglich mussten die Filme anschließend erneut getrocknet werden. Die Herstellung mittels innerer Gelierung erfolgte nach der in Kapitel 2, Abschnitt 2.1.2 beschriebenen Methode mit CaHPO₄/GDL. Der Wachstumsfaktor wurde hier zusammen mit GDL gelöst und erst unmittelbar vor dem Ausgießen zur Alginatlösung gegeben. Die fertigen und trockenen Filme wurden dann in einem EDTA-haltigen Puffer wieder aufgelöst und das gelöste Alginat mittels Festphasenextraktion abgetrennt. Die

so erhaltene EGF-Lösung wurde chromatographisch auf Veränderungen am Molekül untersucht, wobei als Kontrolle eine EGF-Alginatlösung diente, die der gleichen Festphasenextraktion unterworfen wurde. Für diese Versuche wurde EGF in Labor-Qualität verwendet, da die Ausgangssubstanz in möglichst reiner Form vorliegen sollte.

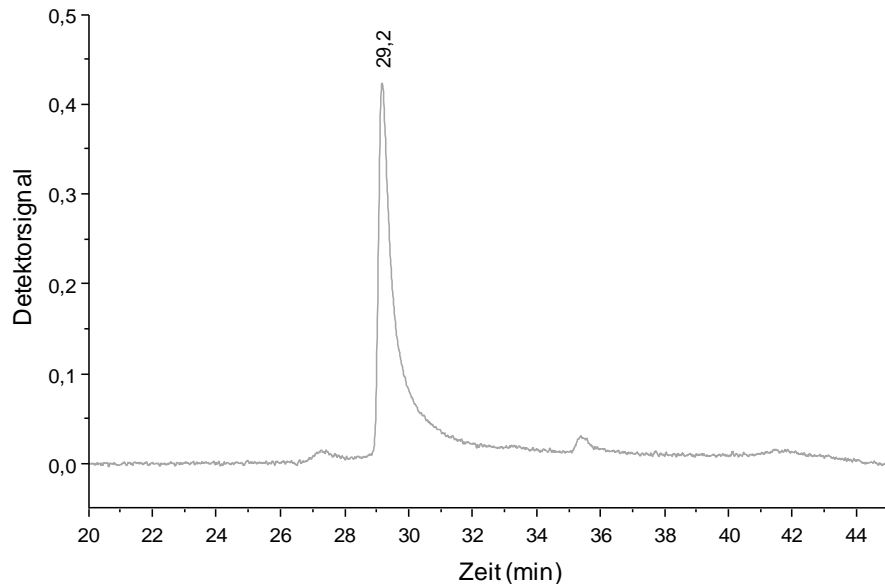


Abb. 41: Chromatogramm von unbehandeltem EGF in 50% Methanol.

Es liegt nahe, dass der in allen Chromatogrammen vorkommende Hauptpeak mit einer Retentionszeit von 29,4 min (vgl. Abb. 42 und Abb. 43) auf unverändertes EGF zurück zu führen ist. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde ein Chromatogramm von reinem, unbehandeltem EGF aufgenommen (vgl. Abb. 41). Dessen Retentionszeit betrug 29,2 min und ist somit im Vergleich zu der in Abschnitt 2.1 gemessenen hier um etwa eine Minute länger. Jedoch muss dabei berücksichtigt werden, dass die Proben nach der Festphasenextraktion nicht mehr in einem rein wässrigen Milieu gelöst waren, sondern in 50% Methanol. Bei der Aufreinigung der Proben wurde EGF an die Festphase gebunden, das Alginat interagiert nicht mit der Phase und wurde deswegen mit dem Lösungsmittel verworfen. Anschließend musste der Wachstumsfaktor von der Festphase eluiert werden, wozu eine 50%ige Methanol-Wasser-Mischung verwendet wurde. Das zur Aufzeichnung des Chromatogramms in Abb. 41 verwendete EGF war ebenfalls in 50% Methanol gelöst.

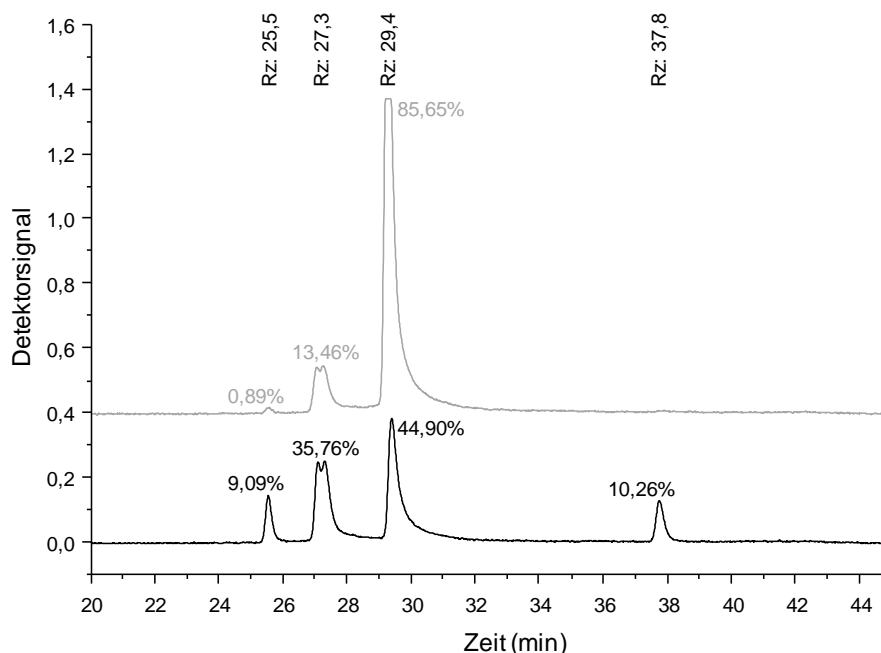


Abb. 42: Chromatogramm zur Stabilitätsuntersuchung bei Herstellung durch äußere Quervernetzung (Fluoreszenz-Detektor, $\lambda_{\text{ex.}}$ 270 nm $\lambda_{\text{em.}}$ 310 nm). Die Prozentzahlen geben den Anteil der jeweiligen Peakfläche an der Gesamtfläche aller detektierten Peaks an.
 — Probe — Kontrolle

Das Chromatogramm in Abb. 42 zeigt deutlich, dass sich das EGF-Molekül während der Herstellung mittels äußerer Quervernetzung verändert: Der Fluoreszenzdetektor zeigt vier Signale, obwohl nur ein Peptid verarbeitet wurde. Proteine zeigen eine sogenannte intrinsische Fluoreszenz, die nach Anregung mit Licht von etwa 280 nm Wellenlänge oberhalb von 300 bis 350 nm gemessen werden kann [91]. Aufgrund der verwendeten Wellenlängen ($\lambda_{\text{ex.}}$ 270 nm und $\lambda_{\text{em.}}$ 310 nm) kann also angenommen werden, dass es sich bei den Signalen um Proteine bzw. Peptide handelt. Die graue Kurve in Abb. 42 zeigt das Ergebnis der Kontrolllösung, aus der das Alginat sofort (ohne die langen Trocknungsphasen) entfernt wurde. Hier sind drei Signale zu erkennen, das heißt die Veränderungen am EGF-Molekül erfolgen auch während der Probenvorbereitung, jedoch in weit geringerem Ausmaß. Insgesamt bleiben in der Kontrolle mehr als 85% des EGFs intakt, während nach der Herstellung nur noch etwa 45% des EGFs in unveränderter Form vorliegen.

Auch nach der inneren Gelierung werden in der HPLC die vier Analyten gefunden, jedoch mit deutlich anderem Verteilungsmuster. Vor allem fällt der große EGF-Peak auf, der noch gut 75% der Gesamtfläche aller gefundenen Peaks ausmacht, während sowohl das Signal bei 25,5 min als auch das bei 37,8 min hier deutlich kleiner ausfallen (vgl. Abb. 43).

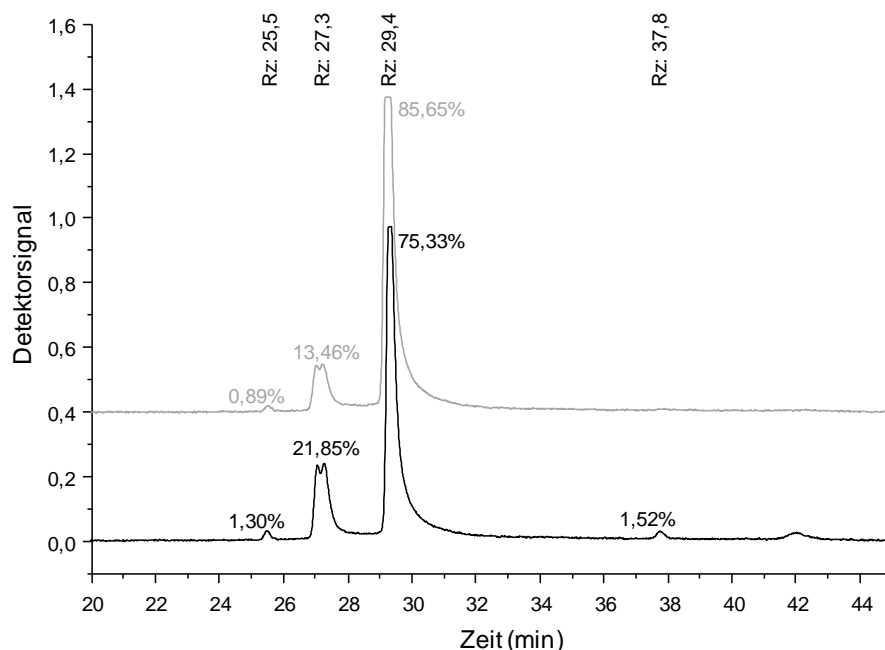


Abb. 43: Chromatogramm zur Stabilitätsuntersuchung bei Herstellung durch innere Quervernetzung (Fluoreszenz-Detektor, λ_{ex} 270 nm; λ_{em} 310 nm). Die Prozentzahlen geben den Anteil der jeweiligen Peakfläche an der Gesamtfläche aller detektierten Peaks an.
 — Probe — Kontrolle

Der Hauptpeak mit einer Retentionszeit von 29,4 min konnte durch das Vergleichsdiagramm in Abb. 41 als EGF identifiziert werden. Um auch den anderen Signalen bestimmte Stoffe zuordnen zu können, wurden die einzelnen Fraktionen am Detektorauslass gesammelt und davon mittels MALDI-ToF Massenspektren aufgenommen (Abb. 44). Da alle Spektren eindeutige Signale aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass die einzelnen Fraktionen jeweils nur ein Peptid enthielten. Betrachtet man zunächst nur das Spektrum des Hauptpeaks bei 29,4 min (also das von EGF), zeigt sich ein etwas zu hohes Molekulargewicht von 6220,3 Da; dieses liegt aber im Rahmen der Messungenauigkeit.

Auch das Massensignal des Signals mit einer Retentionszeit von 27,3 min kann relativ gut zugeordnet werden. Schon die LC/MS-Daten aus Abschnitt 2.1 zeigen, dass unmittelbar vor dem EGF-Peak eine einfach oxidierte Form des Wachstumsfaktors eluiert wird. Diese Beobachtung wird auch in der Literatur beschrieben, außerdem wurde hier das Sulfoxid der Aminosäure Methionin an Position 21 des Peptids als Oxidationsprodukt identifiziert [38]. Dessen theoretisches Molekulargewicht beträgt 6232,05 Da, was gut mit der in Fraktion 2 gemessenen Masse von 6235,3 Da übereinstimmt.

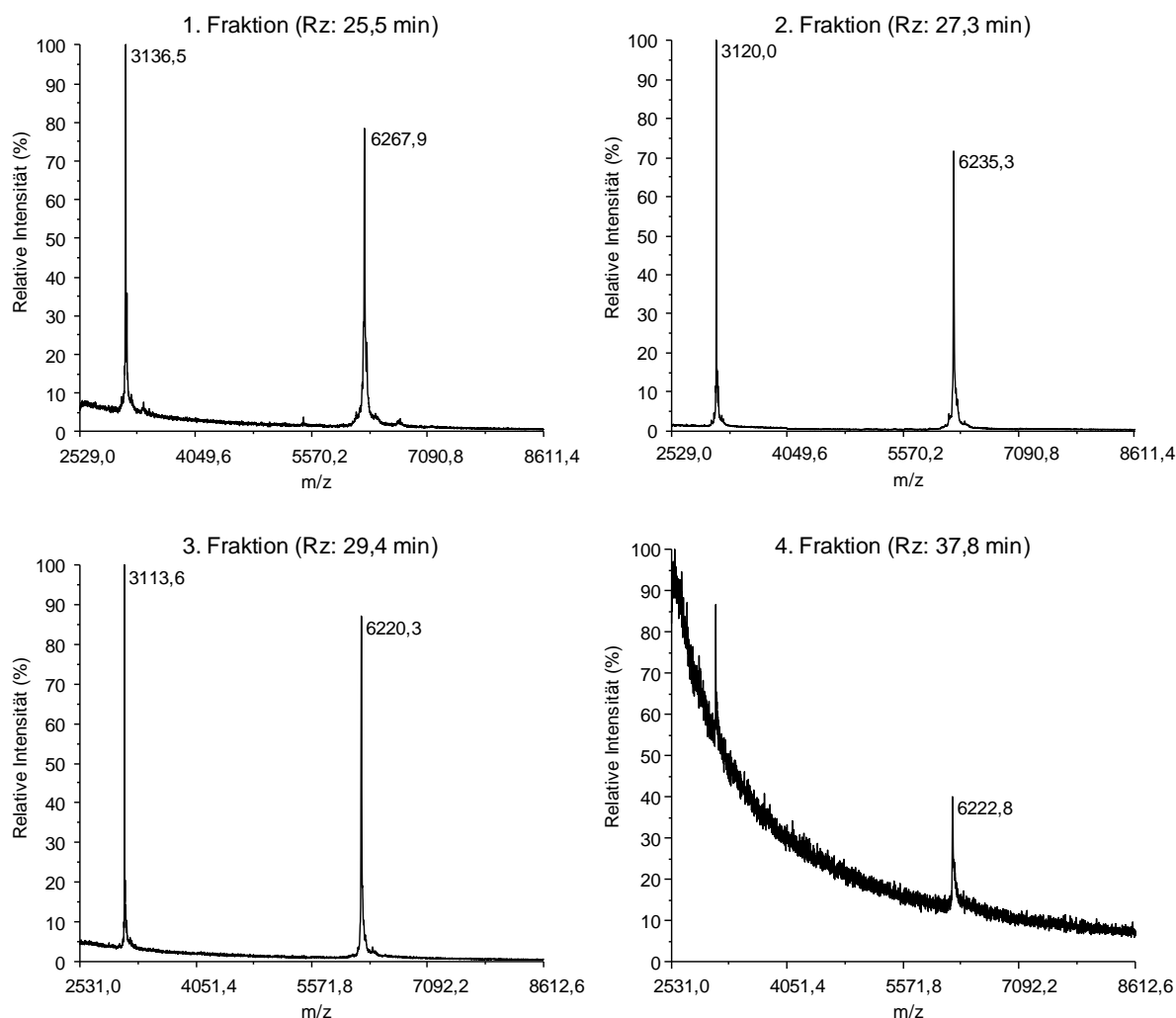


Abb. 44: Massenspektren der einzelnen Fraktionen der Stabilitätsuntersuchung, aufgenommen mittels MALDI-ToF.

Die zwei mittels Massenspektroskopie identifizierten Substanzen zeigen beide etwas zu hohe Molekulargewichte. Offensichtlich sind die von dem verwendeten Gerät gemessenen Molekulargewichte um etwa 4 Da zu hoch, was für die Auswertung der restlichen Spektren von Bedeutung ist. In der vierten Fraktion (Rz: 37,8 min) wurde mit 6222,8 Da ein gegenüber dem unveränderten EGF in Fraktion 3 (6220,3 Da) nur sehr leicht erhöhtes Molekulargewicht gemessen. Senderoff et al. konnten neben der einfachen Oxidation von EGF noch zwei weitere Abbaureaktionen nachweisen: eine Desamidierung von Asparagin an Position 1 der Aminosäurekette und eine Succinimidbildung an der Asparaginsäure in Position 11 [123]. Das Succinimid-Derivat entsteht als Intermediat bei der Desamidierung von Asparagin, wie Abb. 45 zeigt. Dabei wird ein Molekül Ammoniak abgespalten, was zu einer Verringerung des Molekulargewichts von 17 Da führen würde. Bei der darauf folgenden Anlagerung eines Moleküls Wasser können zwei Isomere entstehen, ein Asparaginsäure-Derivat und ein Iso-

Asparaginsäure-Derivat von EGF. Beide Moleküle haben die gleiche Masse, die durch das Wassermolekül wieder um 18 Da zugenommen hat, so dass nach einer Desamidierung das Molekulargewicht des Peptids um 1 Da höher ist als vorher. Daher kann angenommen werden, dass die Substanz mit einer Retentionszeit von 37,8 min ein desamidiertes EGF ist. Die Position der desamidierten Aminosäure kann jedoch nicht festgelegt werden, da EGF insgesamt zwei Asparaginreste (an Position 1 und an Position 32 der Peptidkette) und einen Glutaminrest, der auf die gleiche Weise reagieren kann, an Position 43 enthält.

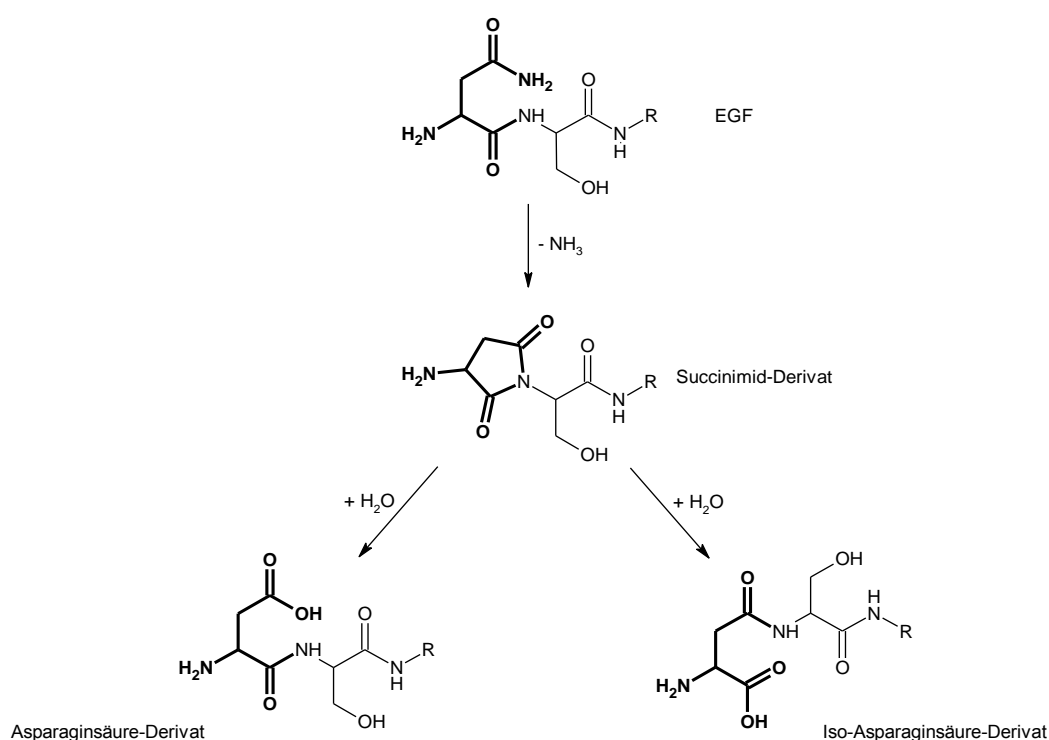


Abb. 45: Mechanismus der Desamidierung von Asparagin (fett gedruckt) in Position 1 der Aminosäurekette von EGF (nach [123]).

Auch das Molekulargewicht der ersten Fraktion (Rz: 25,5 min) hat gegenüber reinem EGF zugenommen: Es beträgt 6267,9 Da. In der Literatur zur Stabilität von EGF wird ein solches Abbauprodukt jedoch nicht beschrieben. Zu den möglichen Reaktionen, die zum Abbau von Proteinen führen, zählen die Hydrolyse der Peptidkette, die β -Elimination und die Razemisierung [94], die jedoch entweder zu leichteren Derivaten führen oder das Molekulargewicht nicht verändern. Eine Desamidierung führt, wie oben beschrieben nur zu einer marginalen Erhöhung der Masse. Lediglich durch eine Oxidation, bei der es zu einer Anlagerung von Sauerstoff kommt, kann das Molekulargewicht stärker zunehmen. Eine dreifache Oxidation von EGF würde in einem Molekulargewicht von etwa 6264 Da resultieren, also nur knapp 4 Da geringer als in der ersten Fraktion gemessen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass es

sich bei dem Abbauprodukt um den dreifach oxidierten Wachstumsfaktor handelt. Von den 20 proteinogenen Aminosäuren können nur Methionin, Cystein, Histidin, Tryptophan und Tyrosin an ihrer Seitenkette oxidiert werden [94]. Am wahrscheinlichsten ist dabei die Oxidation von Methionin, die auch in diesen Versuchen beobachtet wurde. Jedoch ist nur ein einziger Methioninrest in EGF enthalten, so dass noch weitere Aminosäuren oxidiert worden sein müssen. Die Seitenketten der sechs in EGF enthaltenen Cysteine kommen dafür nicht in Frage, da deren Oxidation zur Bildung von Disulfidbrücken führt, ohne dass dabei Sauerstoff angelagert wird [24]. Somit bleiben nur noch Histidin, Tryptophan und Tyrosin als potentiell oxidationsgefährdete Aminosäuren übrig, deren Seitenketten zumindest theoretisch durch sichtbares Licht oxidiert werden können [94].

2.2.2 Semiquantitativer Vergleich der beiden Herstellungsmethoden

Die Identifizierung der Abbauprodukte reicht nicht zur Beantwortung der Frage aus, welche Methode den Wachstumsfaktor am wenigsten beeinträchtigt und damit zur Herstellung EGF-haltiger Augeninserte besser geeignet ist. Dazu müssen die Abbauprodukte auch quantifiziert und die Ergebnisse miteinander verglichen werden. Da sich die Absorptionskoeffizienten der Abbauprodukte durchaus von dem der Ausgangssubstanz unterscheiden können, wurde ein semiquantitativer Vergleich durchgeführt. Dabei wird nicht die absolute Menge der Substanzen bestimmt, sondern lediglich das Ausmaß der Signale zueinander in Relation gesetzt. Dazu wurde die Fläche unter den jeweiligen HPLC-Signalen berechnet und prozentual auf die Gesamtfläche aller Signale bezogen. Beim Vergleich der beiden Methoden zeigt sich, dass bei der äußeren Gelierung weniger EGF in unveränderter Form erhalten blieb (s. Abb. 46).

Der Erklärung dafür liegt offensichtlich im zweiten Trocknungsschritt: Während der Quervernetzung quillt der bereits getrocknete Alginatfilm in der CaCl_2 -Lösung, so dass sich auch der Wirkstoff erneut auflösen kann. Während der zweiten Trocknungsphase kann das Peptid dann in gelöster Form weiter abgebaut werden. Ein weiterer Grund für die in unterschiedlichen Mengen auftretenden Abbauprodukte kann auch der niedrigere pH-Wert während der inneren Gelierung sein. Senderoff et al. haben den Abbau von EGF bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht und dabei festgestellt, dass die Desamidierung bevorzugt bei hohen pH-Werten (> 6) abläuft [123]. Hohe pH-Werte vereinfachen die Bildung des Succinimid-Derivates durch den Angriff des Stickstoffs aus der Peptidbindung zur nächsten Aminosäure am Carbonylsauerstoff der Asparagin-Seitenkette (vgl. Abb. 45) [94]. Bei der inneren Gelierung sinkt der pH-Wert innerhalb der Alginatmatrix aber mit der Zeit, folglich wird die

Desamidierung in geringerem Maße ablaufen. Daher ist hier weniger desamidiertes EGF zu finden als bei der äußeren Gelierung, die ohne eine pH-Wertänderung abläuft. Die Oxidation von Methionin dagegen erfolgt auch bei niedrigen pH-Werten (< 4), weshalb auch nach der inneren Gelierung der Alginatmatrix relativ viel einfach oxidiertes EGF zu finden ist. Wegen des zweiten Trocknungsschritts bei der äußeren Gelierung ist jedoch auch der Anteil an oxidiertem EGF hier höher als nach der inneren Gelierung.

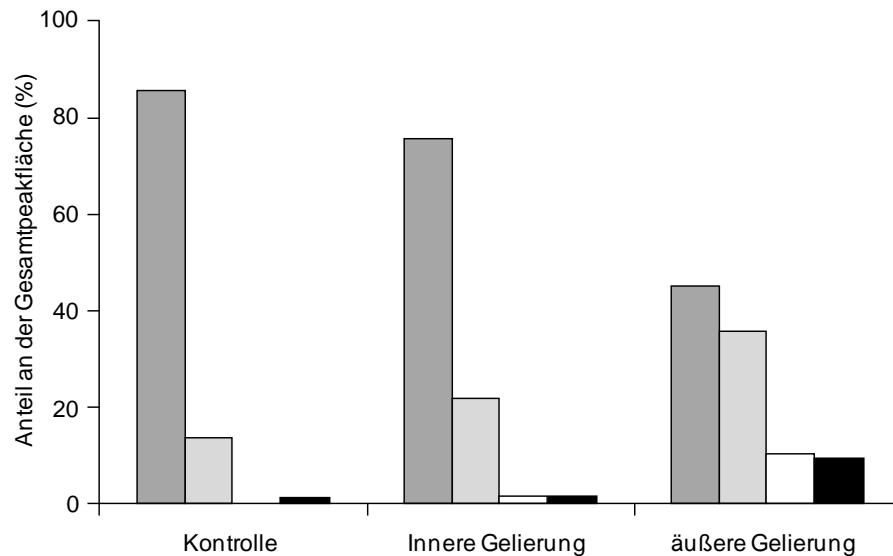


Abb. 46: Semiquantitativer Vergleich der während der Quervernetzung mit $\text{CaHPO}_4/\text{GDL}$ entstehenden Abbauprodukte von EGF.

 unverändertes EGF	 einfach oxidiertes EGF
 desamidiertes EGF	 evtl. dreifach oxidiertes EGF

Abb. 46 zeigt auch den nicht unbeträchtlichen Anteil oxidierten EGFs in der Kontrolle. Dieser ist, wie bereits erwähnt, vermutlich auf die Probenvorbereitung zurück zu führen. Aber auch in unbehandeltem EGF ist teilweise schon die oxidierte Form enthalten (vgl. Abschnitt 2.1 und Abb. 41). Weil die am Methioninrest oxidierte Form des Wachstumsfaktors aber die gleiche Aktivität aufweist wie das unveränderte Molekül [38], stellt zumindest dieses Abbauprodukt kein Problem für die Therapie dar. Auch für desamidiertes EGF gibt es Hinweise, dass es noch eine dem nativen Peptid ähnliche biologische Aktivität besitzt [27]. EGF-beladene Augeninserte sollten daher besser mit Hilfe der inneren Gelierung quervernetzt werden, da dann das inkorporierte Peptid zu annähernd 100% aktiv bleibt, während es nach der äußeren Gelierung etwa 10-20% an Aktivität verliert.

2.2.3 Abhängigkeit der EGF-Stabilität vom eingestellten pH-Wert während der Quervernetzung mit $\text{CaCl}_2/\text{EDTA}$

Bei der dritten Herstellungsmethode für die Augeninserte (mit CaCl_2/GDL) wird der pH-Wert vor der Auflösung von Alginat annähernd neutralisiert. Wie in Kapitel 4 beschrieben, kann der eingestellte pH-Wert dabei in einem großen Bereich von etwa 7 bis >10 liegen, ohne dass die Quervernetzung beeinträchtigt wird. Wie oben beschrieben, kann der pH-Wert aber einen Einfluss auf die Stabilität von EGF haben. Daher wurde die Stabilität des Wachstumsfaktors während der Herstellung in Abhängigkeit vom eingestellten pH-Wert der Alginatlösung vor der Quervernetzung untersucht. Dazu wurde der pH-Wert der $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Lösung vor der Auflösung des Alginats auf 7, 9 oder 11 eingestellt. Die fertigen Alginatfilme wurden wieder in $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -haltigem Phosphatpuffer gelöst und das Alginat mittels Festphasenextraktion aus der Lösung entfernt.

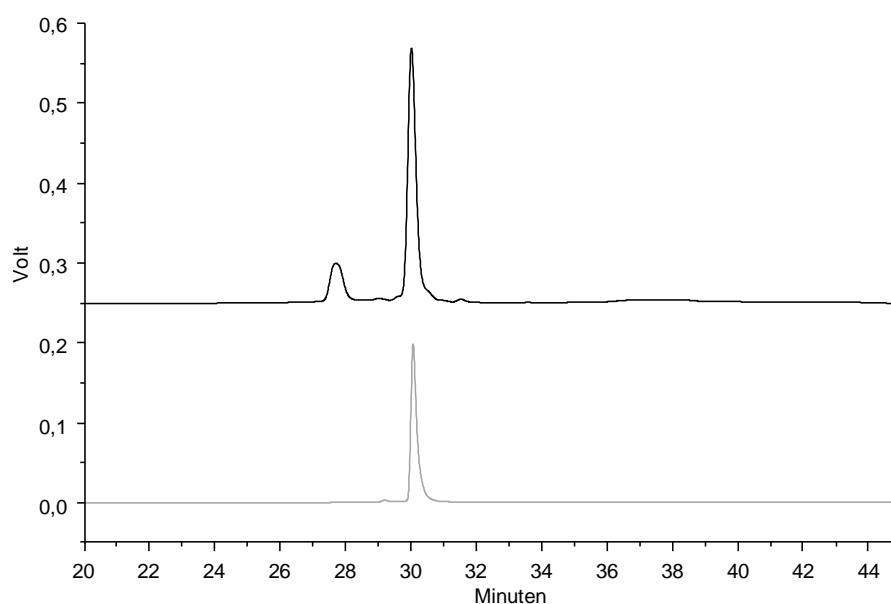


Abb. 47: Repräsentatives Chromatogramm zur Stabilitätsuntersuchung während der Quervernetzung mittels $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$.
(Fluoreszenz-Detektor, $\lambda_{\text{ex.}}$ 270 nm; $\lambda_{\text{em.}}$ 310 nm)
— Probe (pH 11) — Kontrolle

Mit der chromatographischen Untersuchung konnte keine Abhängigkeit der Stabilität vom eingestellten pH-Wert gefunden werden. In Abb. 47 ist exemplarisch eines der aufgenommenen Chromatogramme abgebildet, die alle das gleiche Signalmuster zeigten: Einen großen Peak mit einer Retentionszeit von etwa 30 min und einen diesem vorgelagerten, kleineren Peak nach etwa 27,5 min. Die Vermutung liegt nahe, dass der kleinere Peak das am

Methioninrest oxidierte EGF darstellt, während das unveränderte EGF im Hauptpeak eluiert wird, wie am Vergleichschromatogramm zu sehen.

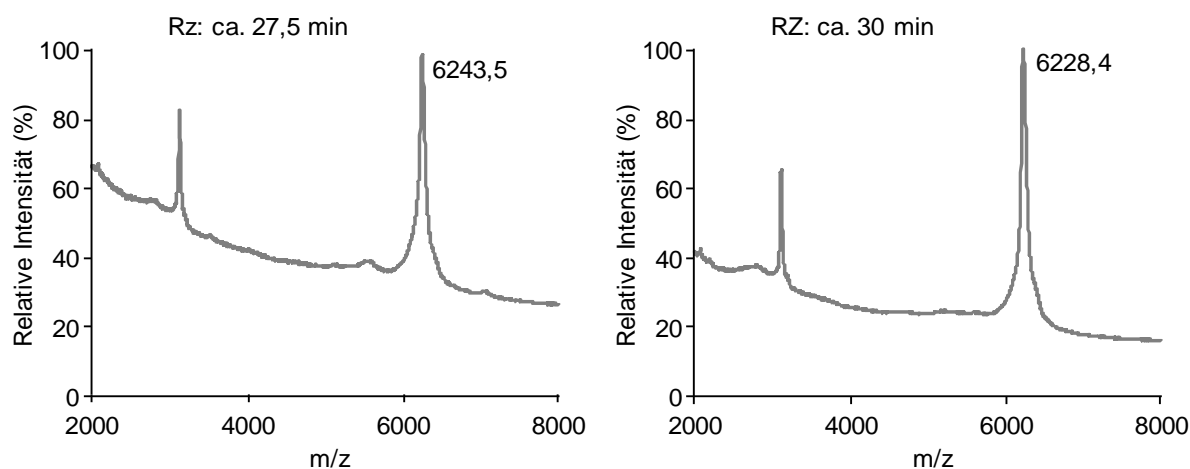


Abb. 48: Massenspektren der beiden Peaks aus der chromatographischen Untersuchung (vgl. Abb. 47), aufgenommen mittels MALDI-ToF.

Zur Verifizierung dieser Vermutung wurde eine größere Menge der Probe injiziert und die beiden Fraktionen gesammelt, um davon ein Massenspektrum aufzunehmen (s. Abb. 48). Die Masse der als zweites isolierten Substanz (Rz von etwa 30 min) war 6228,4 Da, also im Vergleich zur theoretischen Masse von EGF etwa 12 Da zu hoch. Die Substanz aus der ersten Fraktion (Rz: 27,5 min) müsste ein Molekulargewicht von 6232,05 Da haben, wenn es tatsächlich oxidiertes EGF ist. Die tatsächlich gemessene Masse ist 6243,5 Da. Zieht man davon 12 Da ab, weil das Gerät offensichtlich zu hohe Werte misst, erhält man ein Molekulargewicht von 6231,5 Da, was gut zu einfach oxidiertem EGF passt. Während der Quervernetzung mit $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ wurde EGF also nur am Methioninrest oxidiert, ansonsten wurden keine Abbauprodukte detektiert.

Der semiquantitative Vergleich der bei verschiedenen pH-Werten hergestellten Filme zeigt, dass der Abbau unabhängig vom pH-Wert erfolgt: In allen Proben waren etwa 20% oxidiertes EGF zu finden (s. Abb. 49). Die Oxidation am Methioninrest soll nach der Literatur bei hohen pH-Werten langsamer ablaufen, stattdessen erfolgt der Abbau dann bevorzugt durch die Desamidierung [123]. Dass diese hier nicht nachgewiesen wurde, spricht dafür, dass der pH-Wert schneller gesenkt wurde als während der Quervernetzung mittels $\text{CaHPO}_4/\text{GDL}$. Zur Quervernetzung wurde hier tatsächlich mehr Glucono- δ -lacton verwendet als bei den Versuchen mit CaHPO_4 (1% gegenüber 0,4%), was eine schnellere pH-Abnahme erklären würde. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass die Quervernetzung mittels CaCl_2 und $\text{Na}_2\text{-EDTA}$

zur Herstellung von mit EGF beladenen Augeninserten zu bevorzugen ist, da hier zum einen nur ein Abbauprodukt entsteht und zum anderen dieses biologisch aktiv ist.

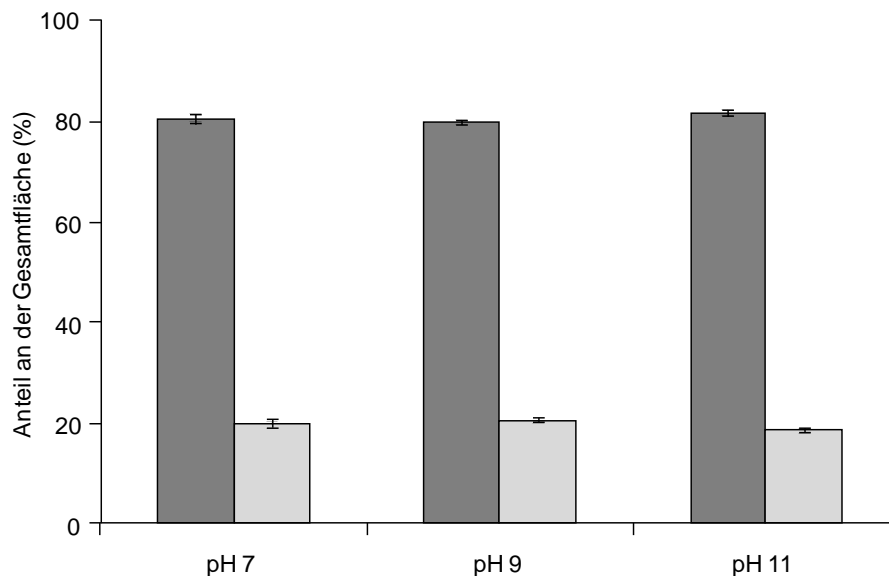


Abb. 49: Semiquantitativer Vergleich der während der Quervernetzung mit $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{-EDTA}$ entstehenden Abbauprodukte von EGF

■ unverändertes EGF □ einfach oxidiertes EGF

2.3 Freisetzung von EGF

Freisetzungsuntersuchungen sind wichtig für die Abschätzung, ob ein Arzneistoff in vivo überhaupt seine Wirkung entfalten kann. Für Augeninserte wird im Europäischen Arzneibuch zwar eine Freisetzung über einen „längeren Zeitraum“ gefordert [32], jedoch wird keine Untersuchungsmethode beschrieben, mit der diese getestet werden soll oder die für Augeninserte besonders geeignet ist. Daher wurde die Freisetzung von EGF aus den Inserten zunächst einfach durch eine Inkubation in Puffer bei 37°C untersucht. Die Proben wurden geschüttelt, um die durch den Lidschlag und die Bewegungen des Augapfels bedingte mechanische Beanspruchung der applizierten Augeninserte zu imitieren. In vivo wird die Tränenflüssigkeit auf der Augenoberfläche kontinuierlich ausgetauscht. Daher erfolgte die Inkubation unter Sink-Bedingungen in einem relativ großen Volumen von 5 ml (das Tränenvolumen im Bindehautsack beträgt normalerweise nur 7-10 µl [115]).

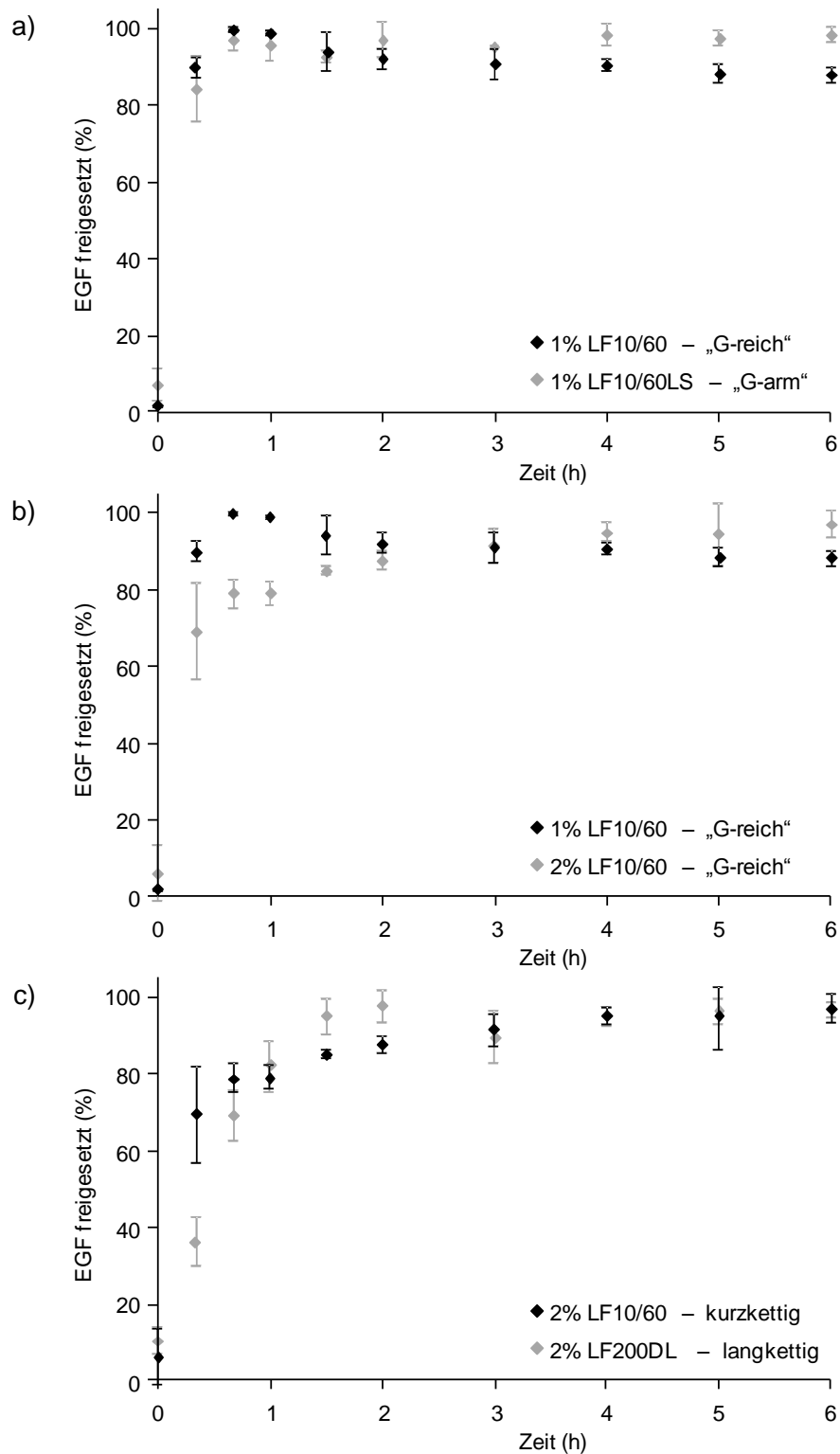


Abb. 50: Freisetzungsuntersuchungen mit EGF-beladenen Augeninserten bei 37°C im Schüttelwasserbad. Als Inkubationsmedium dienten 5 ml Trispuffer, pH 7,4.
 a) Vergleich zweier Alginate mit unterschiedlicher Monomerenzusammensetzung
 b) Verdoppelung der zur Herstellung benutzten Alginatmenge
 c) Vergleich zweier Alginate mit unterschiedlicher Kettenlänge

In einem ersten Versuch wurde mit diesem Freisetzungsmodell der Einfluss des zur Insertherstellung verwendeten Alginattyps (LF10/60LS – „G-arm“ und LF10/60 – „G-reich“) untersucht. Wie in Kapitel 4 gezeigt wurde, bilden diese beiden Typen aufgrund ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung verschieden starke Gele aus. Trotzdem zeigen die beiden Freisetzungsprofile in Abb. 50 a) aber keinen Unterschied, beide Alginatformen setzen mehr als 80% des Peptids in nur 20 min frei und nach weiteren 20 min ist der Wachstumsfaktor komplett in Lösung gegangen. Das aufgrund seines höheren Gehalts an Ca^{2+} -bindender Guluronsäure stärker quervernetzte Alginat (LF10/60) kann also die EGF-Freisetzung gegenüber dem weniger festen Gel (LF10/60LS) nicht verlangsamen.

Um die Freisetzung zu verzögern, wurde im nächsten Schritt die Konzentration der zur Insertherstellung verwendeten Alginatlösung verdoppelt. Daraus resultierten dickere Augeninserte (180 μm gegenüber 115 μm bei Verwendung einer 1%igen Lösung), die die EGF-Freisetzung tatsächlich etwas verlangsamen (s. Abb. 50 b)). Innerhalb der ersten 20 min werden zwar immer noch etwa 70% des eingearbeiteten Wirkstoffs freigesetzt, aber erst nach etwa zwei bis drei Stunden bleibt die EGF-Konzentration im Inkubationsmedium annähernd konstant und die Freisetzung kann als beendet angesehen werden.

Auch der Einfluss der Kettenlänge des Polysaccharids wurde untersucht. Wie in Abb. 50 c) zu sehen ist, wird die bei allen anderen Versuchen beobachtete schnelle initiale Freisetzung durch das längerkettige Alginat LF200DL auf etwa die Hälfte vermindert. Darüber hinaus erfolgt die Freisetzung im weiteren Verlauf gleichmäßiger, jedoch ist auch hier nach circa zwei Stunden das Peptid komplett freigesetzt.

Grundsätzlich können Arzneistoffe aus einer Alginatmatrix auf zwei verschiedene Arten freigesetzt werden: Durch Diffusion innerhalb der Matrix oder durch deren Abbau [140]. Die Freisetzung von EGF erfolgte jedoch deutlich schneller und ungleichmäßiger als die Auflösung der Augeninserte, die erst nach etwa drei bis maximal vier Stunden beendet war (s. Abb. 51). Daher kann die EGF-Freisetzung nicht durch die Erosion der Matrix kontrolliert werden, sondern die Diffusion des Peptids innerhalb der Matrix muss die Freisetzungsgeschwindigkeit bestimmen. Die schnelle Freisetzung kann bei Betrachtung der Ladungsverhältnisse des Peptids und der Matrix erklärt werden. Als Polysaccharid liegt Alginat bei physiologischem pH-Wert in deprotonierter Form vor, ist also negativ geladen. EGF hat einen relativ niedrigen isoelektrischen Punkt von etwa 4,8 und liegt somit bei pH 7,4 ebenfalls als negativ geladenes Peptid vor. Somit kann die Alginatmatrix nicht mit dem Peptid interagieren, im Gegenteil wird durch die Abstoßungskräfte zwischen den beiden gleich geladenen Molekülen der Diffusionskoeffizient des Peptids wahrscheinlich erhöht, wie es zum Beispiel

von Martinsen et al. für BSA nachgewiesen werden konnte [96]. Die gleichen Autoren konnten auch nachweisen, dass der Diffusionskoeffizient von Proteinen innerhalb einer quervernetzten Alginatmatrix von der Alginatkonzentration abhängt. Die aufgrund der erhöhten Alginatkonzentration verringerte Diffusion von EGF kann jedoch den elektrostatischen Effekt allenfalls etwas abmildern, wie an der nur geringfügig langsameren Freisetzung zu erkennen ist. Am effektivsten konnte EGF durch die Verwendung eines längerkettigen Alginats in der Matrix zurück gehalten werden. Offensichtlich setzten die langen Alginatketten dem Peptid einen größeren Widerstand entgegen. Dieser könnte durch die wegen der längeren Ketten erhöhte Viskosität innerhalb der Matrix bedingt sein, da der Diffusionskoeffizient bekanntlich mit zunehmender Viskosität abnimmt [6].

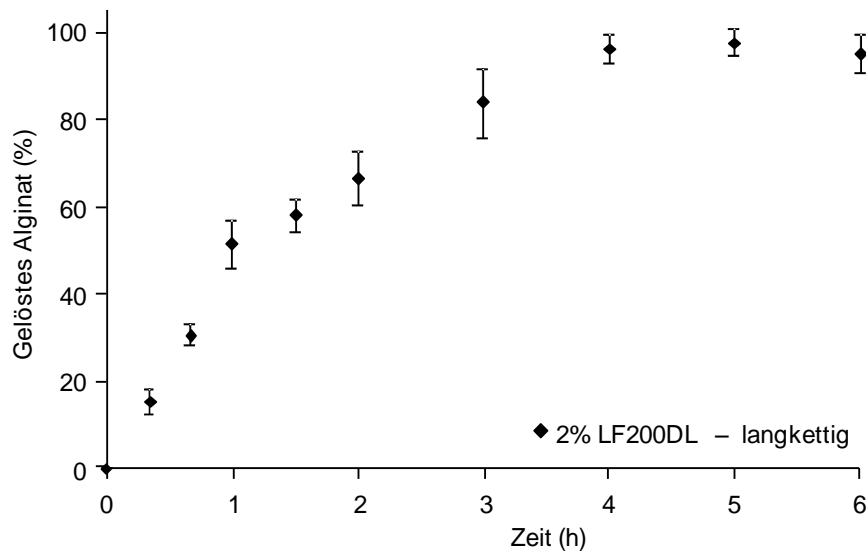


Abb. 51: Beispiele für die Auflösung der Augeninserte während der Freisetzungsuntersuchungen im Schüttelwasserbad (langkettiges Alginat).

Freisetzungsuntersuchungen können die physiologischen Verhältnisse des Körpers nicht genau kopieren, sondern diese nur mehr oder weniger gut nachahmen. Mit Ausnahme des pH-Wertes und der Temperatur entsprechen die hier beschriebenen Versuche allerdings nicht den physiologischen Verhältnissen am Auge, da die Inserte (wie bereits oben erwähnt) in 5 ml Puffer inkubiert wurden. Durch diese Flüssigkeitsmenge wird gewährleistet, dass sich der Wirkstoff komplett lösen kann und das Ergebnis nicht durch eine Sättigung des Freisetzungsmediums verfälscht wird. Normalerweise sind im Auge allerdings nur etwa 7-10 µl Tränenflüssigkeit vorhanden, also ein um ein Vielfaches geringeres Volumen. Daher ist während der Anwendung im Auge ein komplett anderes Freisetzungsverhalten zu erwarten, das wahrscheinlich mehr vom Austausch der Tränenflüssigkeit abhängt.

Um das Modell an die physiologischen Verhältnisse anzupassen, wurde das Freisetzungsverhalten der Augeninserte in einer Durchflusszelle mit kleinerem Volumen bei geringem Fluss untersucht. Das Augeninsert befand sich dabei in einer kleinen Teflonkammer mit einem Volumen von 72 μl , die mit 5 μl Puffer pro Minute gespült wurde. Mit Hilfe eines Fraktionensammlers wurden jeweils 30 min lang Proben gesammelt und das darin gelöste EGF bestimmt.

Die EGF-Freisetzung erfolgte in diesem Modell tatsächlich langsamer, wie in Abb. 52 zu erkennen ist. Wird das zur Verfügung stehende Volumen verringert, erfolgt die Freisetzung über einen Zeitraum von mindestens acht Stunden. Erneut wurde versucht, einen Unterschied im Freisetzungsverhalten der beiden Alginattypen zu messen (vgl. Abb. 52a)). Jedoch überlagerten sich die beiden Freisetzungsprofile auch bei diesem Versuchsaufbau, obwohl in der Literatur ein Unterschied beschrieben wird, der auf der unterschiedlichen Flexibilität der beiden Alginattypen beruhen soll [2]. Mit der Durchflusszelle können aber durchaus Unterschiede im Freisetzungsverhalten nachgewiesen werden, wie bei dem Vergleich der Alginat mit unterschiedlichen Kettenlängen deutlich wird (Abb. 52 b)): Das längerkettige Alginat setzt über den gesamten Zeitraum deutlich weniger EGF frei und nach acht Stunden verbleiben noch etwa 20% des eingesetzten Wachstumsfaktors im Augeninsert. Eine Steuerung der Freisetzung kann also tatsächlich über die Kettenlänge des zur Einbettung von EGF benutzten Alginats erfolgen.

Damit EGF seine volle Wirkung entfalten kann, muss der Wachstumsfaktor über eine Zeitspanne von 6-8 Stunden an seinen Rezeptor binden [67]. Damit es an der Augenoberfläche wirken kann, sollte das Peptid also möglichst lange in ausreichender Konzentration im Tränenfilm vorliegen. Weil der Tränenfilm ständig erneuert wird, ist dazu eine verzögerte Freisetzung des Peptids aus dem Augeninsert notwendig. Während die ersten Freisetzungsversuche in 5 ml Puffer gegen eine lange Wirkungsdauer sprechen, zeigen die Versuche in der Durchflusszelle, dass EGF mit Hilfe der Augeninserte tatsächlich über einen längeren Zeitraum in die Tränenflüssigkeit abgegeben werden kann. Letztlich müsste die Kinetik der Freisetzung aber im Rahmen einer klinischen Studie in vivo überprüft werden, mit der dann auch gleich die Wirksamkeit des freigesetzten EGFs gegen das „Trockene Auge“ gezeigt werden könnte.

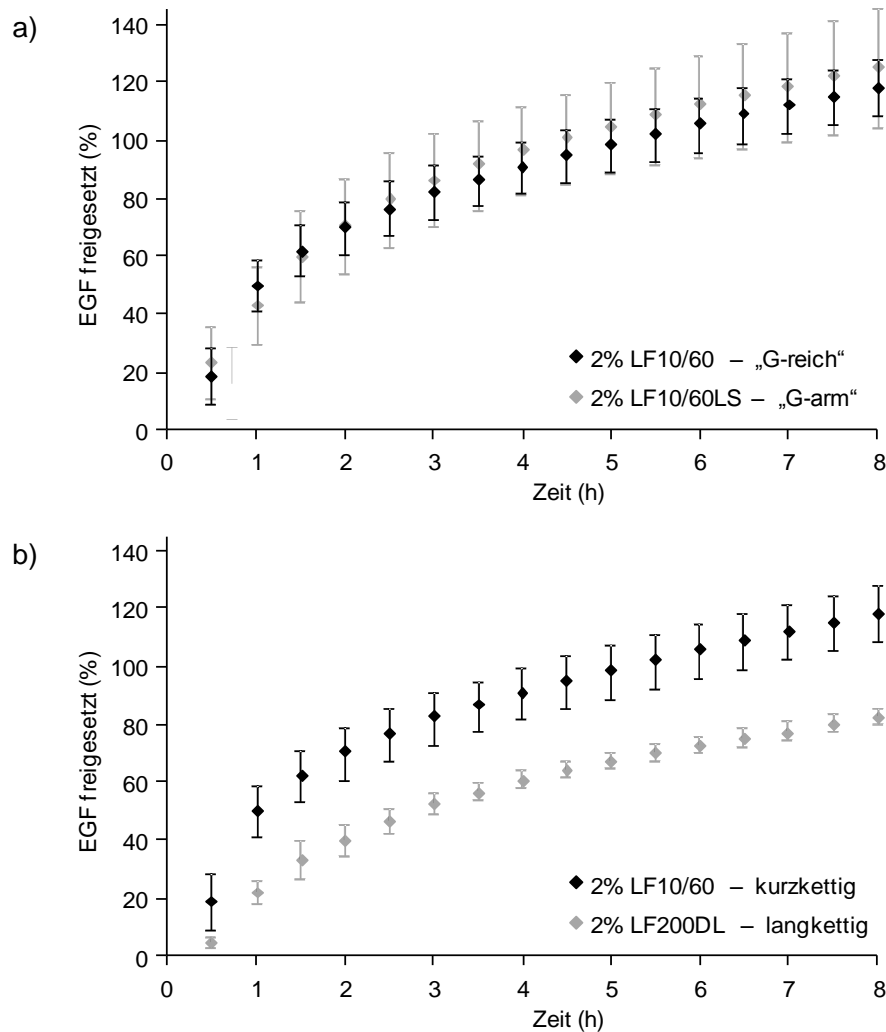


Abb. 52: Freisetzungsuntersuchungen mit EGF-beladenen Augeninserten in der Durchflusszelle.

- a) Vergleich zweier Alginat mit unterschiedlicher Monomerenzusammensetzung
 b) Vergleich zweier Alginat mit unterschiedlicher Kettenlänge

3. Zusammenfassung

Die Identitäts- und Reinheitsuntersuchungen des GMP-konformen EGFs zeigten, dass dieses mehrere EGF-Varianten enthält, die vom C-terminalen Ende her um bis zu fünf Aminosäuren gekürzt sind. Dabei sind EGF₁₋₅₂ und EGF₁₋₅₁ die beiden Hauptbestandteile, die genauso wirksam sind wie unverändertes EGF₁₋₅₃. Für die Stabilitätsuntersuchungen wurde aber das hochreine EGF in Labor-Qualität verwendet, da ansonsten zu viele Abbauprodukte entstanden wären. Die Versuche zeigten, dass die Quervernetzung der Alginatmatrix zur Herstellung von mit EGF beladenen Augeninserten am besten mit Hilfe der inneren Gelierung erfolgen sollte. Dabei wird EGF vorwiegend am Methioninrest oxidiert, wobei auch das entstehende Abbauprodukt biologisch aktiv ist.

Die Untersuchungen zur Freisetzung ergaben, dass diese aufgrund des geringen pI-Wertes von EGF sehr schnell erfolgt. Zur Verlangsamung der Freisetzung eignen sich am besten längerkettige Alginat. Wie die Versuche in der Durchflusszelle zeigten, hängt die Freisetzung dabei sehr von den Umgebungsbedingungen ab. Weil die physiologischen Bedingungen am Auge aber durch die in vitro Versuche nicht genau wiedergegeben werden können, sollte die endgültige Bewertung des Systems erst nach einer klinischen Studie erfolgen.

Kapitel 7

Entwicklung eines Drug Delivery Systems für die intraokuläre Anwendung

1. Einleitung

Die altersbedingte Makuladegeneration führt, wie in Kapitel 1 beschrieben, zur Degeneration des gelben Flecks und damit zu einer drastischen Verringerung der Sehschärfe. In Industrienationen ist sie die Hauptursache für Erblindungen im Erwachsenenalter [35]. Die dem Augenarzt zur Verfügung stehenden Behandlungsmöglichkeiten sind dabei beschränkt, da sich die durch das Alter bedingten Veränderungen nicht umkehren lassen [44].

Die früher häufig durchgeführte Laserkoagulation der neu gebildeten Gefäßschlingen unter der Netzhaut wird heute (wenn überhaupt) nur noch eingesetzt, wenn die zu verödenen chorioidalen Neovaskularisationen (CNV) mindestens 200 µm vom Zentrum der Netzhaut entfernt liegen [60]. Neben der Verödung der neu gebildeten Gefäße liegt dem Verfahren auch eine Anregung der Proliferation von RPE-Zellen durch das Laserlicht zugrunde. Diese umhüllen dann das neue Blutgefäß, dichten es somit ab und absorbieren gleichzeitig die subretinale Flüssigkeit [71]. Da die neu gebildeten Adern aber unter der Netzhaut liegen, wird auch diese durch das Laserlicht geschädigt. Unmittelbar nach der Behandlung kommt es durch die Vernarbung der Netzhaut zu einem deutlichen Gesichtsfeldausfall, der nicht reversibel ist [44; 60].

Eine Verbesserung stellt die photodynamische Therapie (PDT) dar, mit der eine gezielte Zerstörung der Gefäßwucherungen unter der Netzhaut erfolgen kann. Dazu wird der Photosensibilisator Verteporfin intravenös appliziert, so dass er sich im Körper verteilen kann. Aufgrund der liposomalen Formulierung des Arzneistoffs bindet er im Blutplasma an die LDL-Fraktion und kann sich in schnell proliferierenden Zellen, wie zum Beispiel den Endothelzellen neuer Blutgefäße, anreichern. Die Aufnahme in die Zellen erfolgt über den LDL-Rezeptor [112]. Durch Bestrahlung der betroffenen Netzhautregion mit Licht von 689 nm Wellenlänge wird der Arzneistoff angeregt und führt dann zu Zellschäden, die eine selektive Zerstörung der CNV bewirken. Die PDT ist zur Therapie von subfovealen Gefäßneubildungen geeignet, da die Photorezeptoren nicht geschädigt werden und es somit nicht zu einer Abnahme des Visus kommt [71]. Mit der PDT kann die Sehschärfe der Patienten jedoch nicht verbessert werden, sondern es wird lediglich das Fortschreiten der Krankheit verhindert [60; 71].

Wegen der möglichen Verbesserung der Sehschärfe wird die Anwendung von VEGF-Inhibitoren durch die Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft als „*first line*“ Therapie für eine subfoveale CNV empfohlen [8]. Dafür stehen drei Stoffe zur Verfügung: Pegaptanib und Ranibizumab, die beide zur Therapie der AMD zugelassen sind (Pegaptanib in den USA),

sowie Bevacizumab, dass in Kombination mit anderen Zytostatika zur Krebstherapie zugelassen ist. Pegaptanib ist ein Oligonukleotid-Aptamer, das spezifisch VEGF₁₆₅ (die am weitesten verbreitete Isoform von VEGF-A) bindet [107]. Es muss alle sechs Wochen intravitreal injiziert werden, wird aber wegen des begrenzten Erfolges (nur bei wenigen Patienten verbesserte sich die Sehschärfe) kaum noch eingesetzt [60].

Ranibizumab dagegen ist ein Antikörperfragment, das nach der intravitrealen Injektion durch die Retina diffundieren kann und alle Isoformen von VEGF-A bindet. Somit wird die Neubildung von Gefäßen unter der Netzhaut gehemmt und deren Hyperpermeabilität verringert [8]. Auf die gleiche Weise wirkt auch der Vollantikörper Bevacizumab, dessen Penetration durch die Retina in einer Studie an Affen nachgewiesen werden konnte [51]. Mit beiden Stoffen kann die Sehschärfe der AMD-Patienten erstmalig verbessert werden. Ein möglicher Nachteil der VEGF-Antikörper ist das erhöhte Schlaganfallrisiko bei systemischer Gabe, das aber durch die lokale Applikation der Wirkstoffe eigentlich umgangen werden sollte. Tatsächlich wurden in den Zulassungsstudien für Ranibizumab keine Anhaltspunkte für systemische Nebenwirkungen gefunden [8]. Da aber die Blut-Retina-Schranke bei der altersbedingten Makuladegeneration aufgrund der erhöhten Permeabilität der neu gebildeten Gefäße durchlässiger wird, bleibt zumindest ein theoretisches Risiko für derartige Nebenwirkungen, auch nach lokaler Applikation in den Glaskörperraum, bestehen [60].

Sowohl Ranibizumab als auch Bevacizumab werden intravitreal appliziert und müssen im Abstand von vier Wochen reinjiziert werden. Mit Ranibizumab kann das Intervall nach einer initialen Behandlungsphase von drei Monaten je nach Ansprechen der Therapie auf bis zu drei Monate verlängert werden [16]. Trotzdem müssen die Injektionen weiter erfolgen, um den Erfolg der Therapie nicht zu gefährden. Jede intravitreale Injektion ist mit dem Risiko schwerwiegender Nebenwirkungen behaftet. So kann es in 0,15% der Fälle zu Komplikationen wie einer Endophthalmitis, einer Netzhautablösung oder einem traumatischen Katarakt kommen [62]. Weitere Ereignisse können Uveitiden, intraokuläre Blutungen oder eine Erhöhung des Augeninnendrucks sein [59]. Daher ist es sinnvoll, die Zahl der intravitrealen Injektionen zu minimieren, zumal sie für die Patienten eine nicht unerhebliche psychische Belastung darstellen.

Quervernetzte Hydrogele stellen eine Möglichkeit dar, die Freisetzung von Wirkstoffen zu verzögern und dadurch das Dosierungsintervall zu vergrößern. Allerdings ist deren Anwendung im Auge schwierig, weil die Applikation durch eine schmale Kanüle erfolgen muss. Daher wurde am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg ein auf Polyethylenglykol basierendes in situ gelierendes Hydrogel entwickelt, das als Flüssigkeit

applizierbar ist. Dazu wurden zwei Vorstufen synthetisiert, die bei Kontakt miteinander auch unter physiologischen Bedingungen polymerisieren und ein dreidimensionales Gelnetzwerk ausbilden [10]. Die erste Komponente ist ein verzweigtes, vierarmiges PEG-Succinimidyl-propionat mit einem Molekulargewicht von etwa 10000 Da. Dieses ist aminreaktiv und reagiert mit der zweiten Komponente, einem ebenfalls verzweigten, vierarmigen PEG-Amin (s. Abb. 53). Durch die Verzweigung der beiden Komponenten bildet sich bei der Reaktion ein zusammenhängendes, quervernetztes Gelgerüst aus.

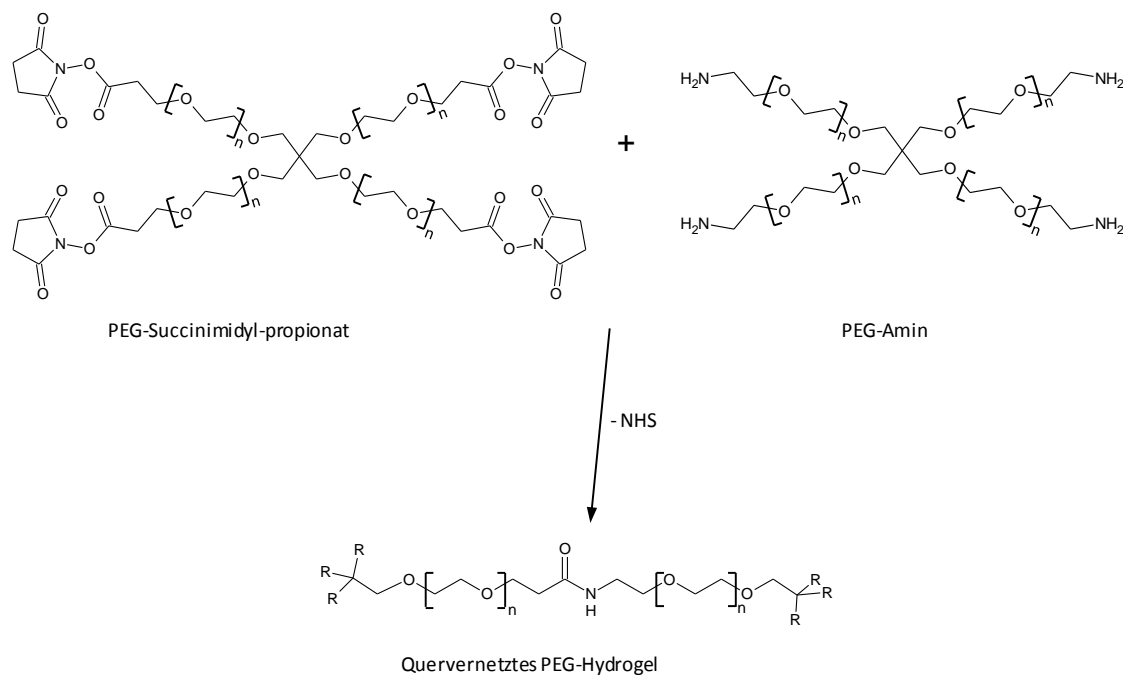


Abb. 53: Gelierung des in situ gelierenden PEG-Hydrogels:

Das aminreaktive PEG-Succinimidyl-propionat reagiert mit dem PEG-Amin unter Abspaltung von N-Hydroxysuccinimid (NHS). Die Reaktion läuft unter physiologischen Bedingungen ab.

Zur Herstellung eines Gels werden die beiden Komponenten zunächst getrennt voneinander gelöst. Die Gelbildung beginnt, sobald die beiden Lösungen miteinander gemischt werden. Da zu Beginn der Gelierung das System noch flüssig ist und es erst nach einigen Minuten gelförmig wird [10], kann die Injektion in das Auge also mit Hilfe einer Doppelkammerspritze erfolgen.

Grundsätzlich kann der Succinimidylester mit allen freien Aminogruppen reagieren. Da auch Proteine wie zum Beispiel Antikörper freie Aminogruppen tragen, kann theoretisch nicht ausgeschlossen werden, dass ein gelöstes Protein bei der in situ Gelierung in das Gelnetzwerk einpolymerisiert wird. Ein kovalent in das Netzwerk eingebundenes Protein könnte jedoch

nicht mehr freigesetzt werden und könnte folglich auch seine Wirkung im Auge nicht entfalten. Daher müsste zur Beladung der Gele mit einem Protein die Reaktivität der protein-gebundenen Aminogruppen herabgesetzt bzw. die Aminogruppen der Reaktion ganz entzogen werden. Das hier genutzte Verfahren dazu beruht auf der Ausfällung der Proteine mit löslichem Polyethylenglykol (PEG). Zunächst wurde dieses Verfahren mit bovinem γ -Globulin als Modellprotein etabliert und die zur Ausfällung der Antikörper benötigte Konzentration an löslichem PEG bestimmt. Der Einfluss des zusätzlichen PEGs auf die Gelierung des in situ-gelierenden Systems wurde am oszillierenden Rheometer untersucht. Dazu wurden die beiden Gelkomponenten unmittelbar vor der Messung in gelöstem PEG getrennt voneinander aufgelöst, gemischt und sofort auf das Rheometer gegeben.

Das nach dem etablierten Verfahren hergestellte und mit Protein beladene in situ-gelierende PEG-Hydrogel wurde sodann mit Hilfe von Freisetzungsuntersuchungen auf seine Eignung als Drug Delivery System getestet. Auch hier wurde zunächst ein Modellprotein, nämlich humanes Immunglobulin G verwendet, das mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) fluoreszenzmarkiert war. Erst danach wurde der Wirkstoff Bevacizumab (Avastin[®]) in das Gel eingearbeitet, um einen Einfluss des an die Aminogruppen des IgG angebundenen Fluoreszenzfarbstoffes auszuschließen.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1.1 Beladung der PEG-Hydrogele mit Proteinen

Bevacizumab (Avastin[®]) ist ein monoklonaler, humanisierter Antikörper und besteht aus zwei leichten und zwei schweren Aminosäureketten. Neben den vier N-Termini dieser Ketten sind in dem Molekül noch insgesamt 90 Lysinreste mit primärem aliphatischem Amin in der Seitenkette enthalten, die theoretisch mit dem Succinimidylester des in situ gelierenden PEG-Hydrogels reagieren können [50]. Ob sie tatsächlich reagieren, hängt auch davon ab, wie zugänglich die jeweilige Amingruppe im Protein ist.

Um die Reaktion des Antikörpers mit der Vorstufe des PEG-Hydrogels zu verhindern, sollte Bevacizumab als Feststoff verarbeitet werden. Dazu muss die Löslichkeit des Proteins in Wasser herabgesetzt werden. Mit Hilfe von Polyethylenglykol können Proteine aus Lösungen ausgefällt werden, ohne dass es zu deren Denaturierung kommt [58]. Mit Lösungen verschiedener Polyethylenglykole wurde zunächst versucht, die zur vollständigen Präzipitation von Antikörpern aus deren Lösungen erforderliche, minimale PEG-Konzentration zu finden. Da Bevacizumab sehr teuer ist, wurden die Versuche mit γ -Globulinen aus bovinem

Blut durchgeführt. Die γ -Globulinfraktion der Plasmaproteine wird von den Immunglobulinen gebildet und enthält neben den IgG-Antikörpern (zu denen Bevacizumab zählt) auch IgA- und IgM-Antikörper [64].

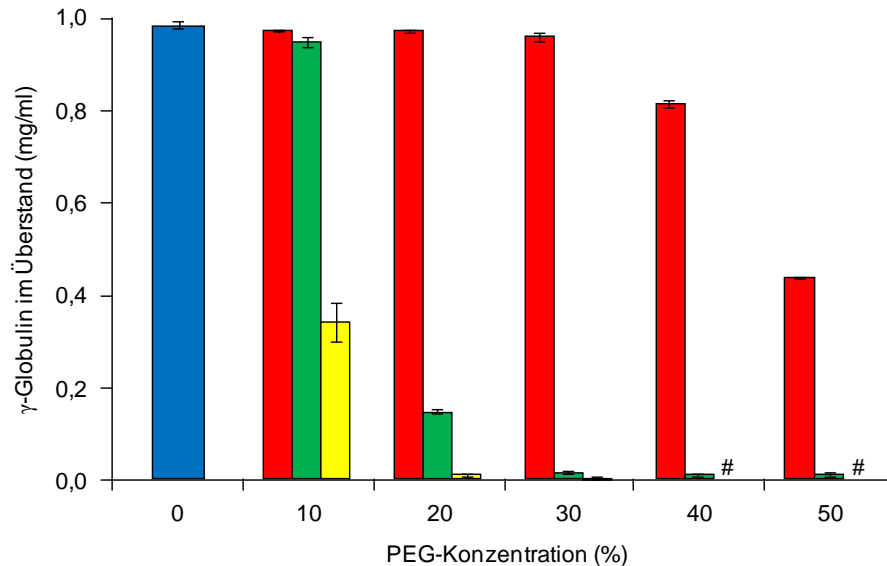


Abb. 54: Ausfällung von γ -Globulinen mit Hilfe von verschiedenen PEG-Lösungen.

■ Kontrolle (ohne PEG) ■ PEG 400
■ PEG 2000 ■ PEG 10000
 # konnte nicht vermessen werden

In Abb. 54 sind die Ergebnisse der Versuche zusammengefasst, für die eine γ -Globulin-Lösung mit der jeweiligen PEG-Lösung so gemischt wurde, dass die entstehende Lösung bzw. Suspension 1 mg Protein pro Milliliter enthielt. Dabei wurden PEGs mit verschiedenen Kettenlängen verwendet: PEG 400, PEG 2000 und PEG 10000. Das ausgefällte Protein wurde abzentrifugiert und der klare Überstand UV-spektroskopisch vermessen.

In der Kontrollgruppe (reiner Puffer ohne PEG) blieb erwartungsgemäß die gesamte Proteinmenge in Lösung. Durch das kurzkettige PEG 400 konnten die Antikörper zwar ausgefällt werden, jedoch reichten die untersuchten Konzentrationen nicht zur vollständigen Präzipitation aus. Bis zu einer Konzentration von 30% (m/V) PEG 400 fiel praktisch kein Protein aus, erst ab 40% (m/V) begann die Präzipitation, wobei auch mit der höchsten Konzentration (50% (m/V)) die γ -Globuline nicht vollständig abgetrennt werden konnten. Von PEG 2000 dagegen reichten schon 30% (m/V) für eine vollständige Präzipitation aus; mit mehr PEG konnte die in Lösung bleibende Menge Protein nicht mehr verringert werden. Dabei fällt auf, dass mit 10% (m/V) noch nahezu die gesamte Proteinmenge gelöst blieb. PEG10000 war am effektivsten, da schon in Gegenwart von nur 10% (m/V) ein Großteil der Proteinmenge (> 60%) ausfiel. Um das Protein quantitativ zu präzipitieren reichten

20% (m/V) des langkettigen PEG 10000 aus. Gerade die höher konzentrierten Lösungen von PEG 10000 (ab 40% (m/V)) sind allerdings sehr viskos, so dass sich beim Einfüllen in die Küvette leicht Schlieren bildeten und die betreffenden Lösungen nicht vermessen werden konnten.

In der Literatur wird für die Präzipitation von Proteinen durch PEG ein Verdrängungsmechanismus beschrieben. Danach belegt gelöstes PEG als inertes Polymer bestimmte Bereiche im Lösungsmittel, aus denen das Protein sterisch ausgeschlossen wird. Folglich konzentriert sich dieses in dem PEG-freien Bereich des Lösungsmittels, bis seine Löslichkeit überschritten wird und es schließlich zur Präzipitation kommt [3]. Die Verringerung der Löslichkeit des Proteins hängt dabei in erster Linie von der Größe des Proteins und der Kettenlänge des Polymers ab [58]. Der Grund für die unterschiedliche Effektivität der hier verwendeten PEGs liegt also in deren verschieden langen Polymerketten: PEG 10000 (die Zahl gibt das mittlere Molekulargewicht an) besteht aus etwa 227 sich wiederholenden Einheiten, während PEG 400 nur neun solcher Einheiten aufweist. Damit hat PEG 400 eine deutlich geringere räumliche Ausdehnung als PEG 10000 und folglich ist die sterische Behinderung der relativ großen Antikörper (ca. 150 kDa) durch PEG 400 weniger effizient [3]. Die Effizienz des PEG 2000 (mit etwa 45 Einheiten) liegt erwartungsgemäß zwischen den beiden anderen Polymeren.

Wegen der geringen Löslichkeit eines Proteins bei seinem isoelektrischen Punkt (IEP) ist zu erwarten, dass auch der pH-Wert bei der Präzipitation von Proteinen durch PEG eine Rolle spielt. Beispielsweise kann Albumin, dessen IEP im Bereich von 4,6-4,7 liegt, bei neutralem pH-Wert nicht vollständig ausgefällt werden [49]. Daher wurde stattdessen die γ -Globulinfraktion der Plasmaproteine als Modellprotein verwendet. Auch der isoelektrische Punkt des IgG-Antikörpers Bevacizumab (errechnet wurde ein Wert von 8,1 [133]) gestattet das vollständige Ausfällen des Proteins bei neutralem pH, so dass die Forderung nach pH-neutralen Lösungen zur intraokularen Injektion [29] erfüllt werden kann.

Zur vollständigen Präzipitation der Proteine werden, je nach Kettenlänge, 20-30% (m/V) PEG benötigt. Die Herstellung der PEG-Hydrogele aus den beiden Vorstufen (PEG-Succinimidyl-Propionat und PEG-Amin, s. Abschnitt 1) erfolgt aber mit insgesamt nur 4% Polymer. Folglich muss zur Beladung der PEG-Hydrogele mit Antikörpern noch zusätzliches, nicht-quervernetzbares PEG zugefügt werden, das dann in deutlichem Überschuss vorliegt, so dass ein Einfluss auf die Gelierung nicht ausgeschlossen werden kann. Daher wurde die Gelierung der PEG-Hydrogele am oszillierenden Rheometer sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von 30% PEG 2000 untersucht.

Wie aus Abb. 55 ersichtlich, verkürzt sich die Gelierungsdauer durch Zugabe von nicht-quervernetzbarem PEG auf etwa die Hälfte. Außerdem steigt das Speichermodul G' in Gegenwart von PEG 2000 nur auf etwa die Hälfte des Werts ohne PEG an. Je höher G' ist, desto elastischer, also desto besser quervernetzt ist das Gel. Der Zusatz von PEG 2000 hat also tatsächlich einen Einfluss auf die Gelierung des PEG-Hydrogels, die entstehenden Gele sind weniger fest als ohne zusätzliches PEG. Des Weiteren könnte auch das präzipitierte Protein einen Einfluss auf die Gelierung haben. Wie die untere Grafik in Abb. 55 zeigt, ist das jedoch nicht der Fall. Der Einfluss des nicht-quervernetzbaren PEGs bleibt bestehen, aber weder die Gelierungsdauer noch das Ausmaß der Quervernetzung ändern sich wesentlich gegenüber dem proteinfreien Gel.

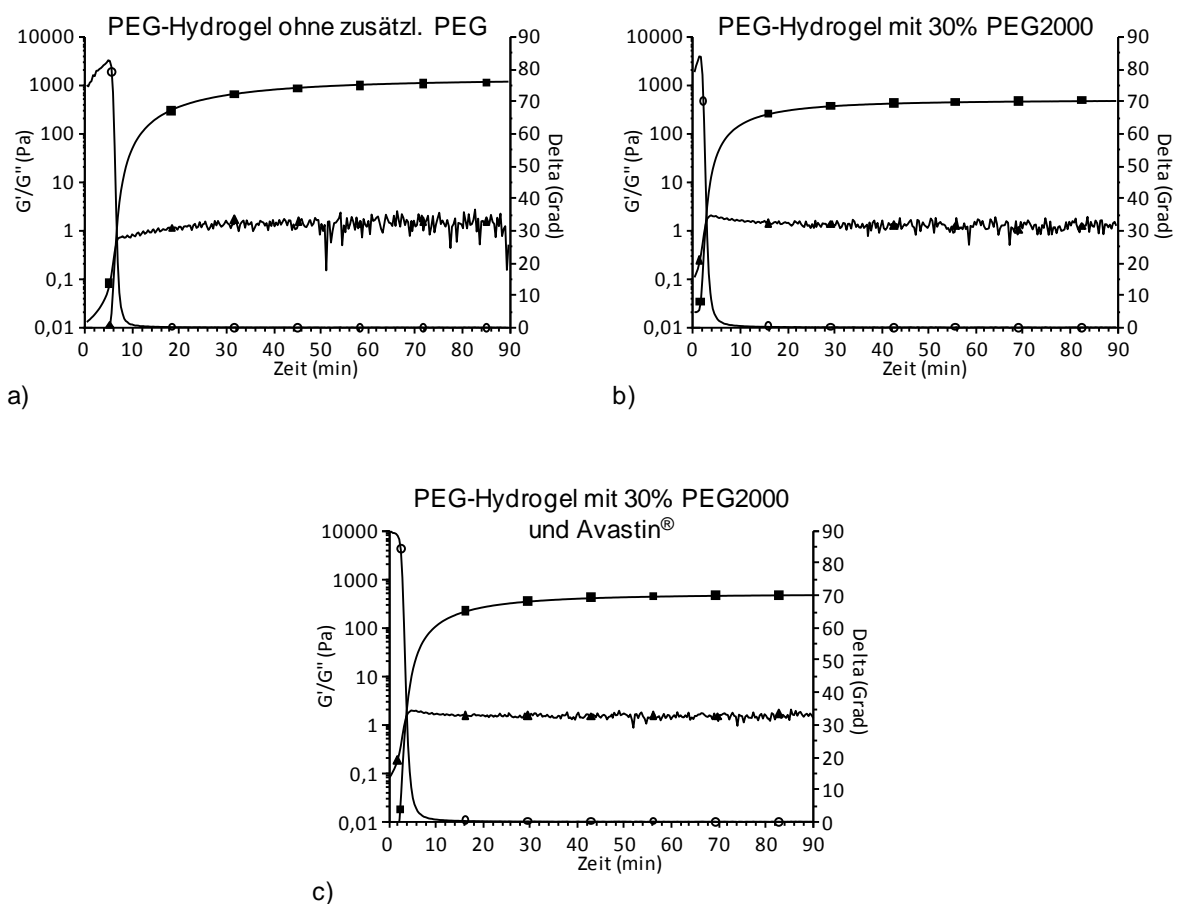


Abb. 55: Rheologische Untersuchungen der Gelierung von in situ gelierenden PEG-Hydrogelen:

- a) ohne zusätzliches PEG
 - b) mit zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG
 - c) mit zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG und Bevacizumab (Avastin®)
- - Speichermodul (G') ▲ - Verlustmodul (G'') ○ - Phasenverschiebung (δ)

2.1.2 Freisetzung von FITC-IgG

Wie die oben beschriebenen Versuche zeigen, können Proteine mit PEG erfolgreich ausgefällt werden. Gleichzeitig können auch in Gegenwart von nicht-quervernetzbarem PEG aus den beiden Vorstufen (PEG-Succinimidyl-Propionat und PEG-Amin) noch in situ gelierende Gele hergestellt werden. Diese sind allerdings weniger fest als vergleichbare Gele ohne zusätzliches PEG. Um zu zeigen, dass die mit Hilfe von nicht-quervernetzbarem PEG ausgefällten und in die PEG-Hydrogele eingearbeiteten Proteine nicht im Gel fixiert sind, wurden Freisetzungsforschungen durchgeführt. Dazu wurden die Gele in Puffer (pH 7,4) bei 37°C inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten Proben gezogen. Als Protein wurde humanes Immunglobulin G eingesetzt, das mit Fluoreszeinisothiocyanat markiert war (FITC-IgG).

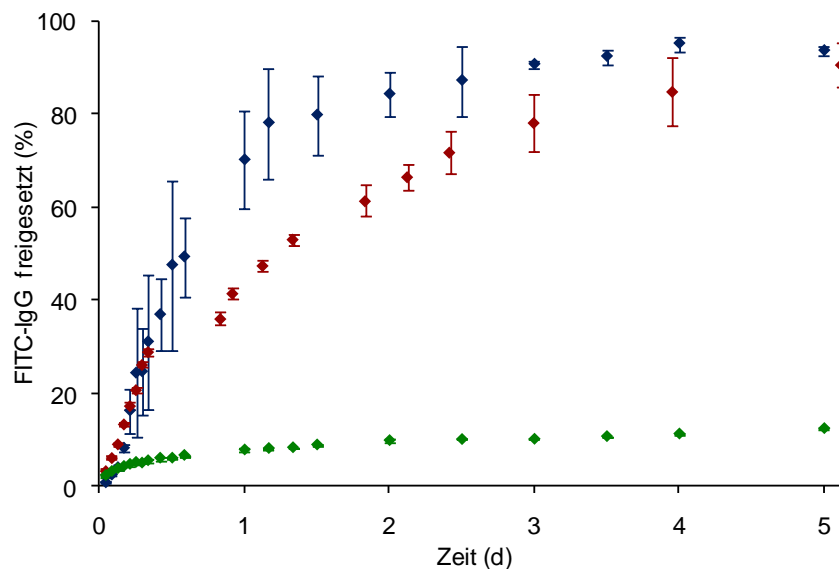


Abb. 56: Freisetzung von FITC-IgG aus PEG-Hydrogelen

- ◆ Kontrolle, ohne zusätzliches PEG
- ◆ mit 30% (m/V) zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG 2000
- ◆ mit 50% (m/V) zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG 400

In Abb. 56 sind die jeweiligen Freisetzungskurven für Gele ohne zusätzliches PEG und mit 30% PEG 2000 bzw. 50% PEG 400 zu sehen. Die Freisetzung erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen und schon am ersten Tag zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem einfachen PEG-Hydrogel (ohne zusätzliches PEG) und den PEG-Hydrogelen, die zusätzlich nicht-quervernetzbares PEG enthielten. Im weiteren Verlauf wird dieser Unterschied noch deutlicher, und nach fünf Tagen waren in der Kontrollgruppe lediglich 10% der eingesetzten Proteinmenge freigesetzt, während die Gele mit zusätzlichem PEG im gleichen Zeitraum über 80% des Proteins freisetzen. Die Freisetzungskurven der beiden PEG-enthaltenden Hydro-

gele verliefen dagegen erst ab dem zweiten Tag unterschiedlich. Die FITC-IgG-Freisetzung aus dem Hydrogel mit 30% zusätzlichem PEG 2000 verlangsamte sich leicht gegenüber dem weiterhin relativ schnell freisetzenden Gel mit 50% PEG 400. Die Freisetzung aus diesem Gel war dann auch schneller beendet, nach etwa drei Tagen zeigt die Kurve ein Plateau mit nur leicht schwankenden Werten. Im Vergleich dazu setzte das Gel mit 30% PEG 2000 bis zu Tag fünf frei, die Werte bilden auch gegen Ende des Versuchs kein erkennbares Plateau.

Da Proteine freie Aminogruppen tragen, können sie mit dem PEG-Succinimidyl-Propionat reagieren und folglich kovalent in das Hydrogelnetzwerk eingebunden werden. Die sehr geringe Freisetzung aus dem PEG-Hydrogel ohne zusätzliches PEG deutet darauf hin, dass FITC-IgG in das Gelnetzwerk „einpolymerisiert“, d.h. kovalent an das Gelgerüst gebunden wurde. Die sich dabei bildende Amidbindung zwischen dem Protein und dem Gelnetzwerk wird aufgrund ihrer Stabilität unter den milden Bedingungen der Freisetzung (37°C, pH 7,4) nicht gespalten. Daher verbleibt ein Großteil des inkorporierten Proteins im PEG-Hydrogel.

Wie bereits erwähnt, setzt das PEG 2000 enthaltende Hydrogel das Protein etwas langsamer frei als das Gel mit 50% PEG 400. Dieser Unterschied dürfte darauf zurück zu führen sein, dass mit PEG 2000 mehr Protein ausgefällt wird und die Auflösung des Proteins einen zusätzlichen, die Freisetzung verlangsamenen Faktor darstellt. Theoretisch könnten die beobachteten Unterschiede in der Freisetzung auch auf einer unterschiedlichen Quellung der Hydrogele beruhen. Das kann jedoch ausgeschlossen werden, da alle Gele (auch die PEG-Hydrogele der Kontrollgruppe, die ohne zusätzliches PEG hergestellt wurden) in gleichem Ausmaß quellen [11].

In einem zweiten Freisetzungsversuch wurden zur Beladung von PEG-Hydrogelen mit der FITC-IgG-Suspension unterschiedliche Mengen PEG 2000 eingesetzt. Damit sollte gezeigt werden, dass der mobile Anteil des inkorporierten Proteins abnimmt, wenn weniger nicht-quervernetzbares PEG zur Protein-Präzipitation eingesetzt wird. Wie Abb. 57a) zeigt, werden innerhalb der ersten elf Tage aus den drei Gelen deutlich unterschiedliche Mengen an FITC-IgG freigesetzt. Das Gel mit 30% (m/V) nicht-quervernetzbarem PEG 2000 setzte mit etwa 60-80% die größte Menge FITC-IgG frei, allerdings schwankten hier die Werte der einzelnen Gele auch am stärksten. Das Gel mit der mittleren Konzentration an nicht-quervernetzbarem PEG 2000 setzte etwa 60% der eingearbeiteten Antikörper frei, das mit der geringsten Konzentration von 10% (m/V) PEG 2000 nur etwa 40%. In der Kontrollgruppe ohne zusätzliches PEG wurden 20% FITC-IgG freigesetzt. Im weiteren Kurvenverlauf (bis 50 Tage) zeigt sich, dass aus allen Gelen (auch in der Kontrollgruppe) weiterhin fluoreszenzmarkierte Antikörper freigesetzt werden. Allerdings fällt der weitere Anstieg der FITC-IgG-

Konzentration bei der Gruppe mit 30% (m/V) zusätzlichem PEG 2000 weniger deutlich aus, da hier die Standardabweichungen generell recht groß sind. Am Ende der untersuchten Freisetzungsdauer (nach 51 Tagen), wurden aus den Gelen der Kontrollgruppe etwa 35% der inkorporierten Antikörper freigesetzt, aus den anderen Gelen circa 60% (10% (m/V) PEG 2000), 70% (20% (m/V) PEG 2000) bzw. 85% (30% (m/V) PEG 2000). Die Abbildung zeigt auch, dass die Freisetzung nach 30 Tagen beendet war, da die Konzentration nach dieser Zeit nicht mehr weiter zunahm. Keines der untersuchten Hydrogele setzte die gesamte eingearbeitete FITC-IgG-Menge frei.

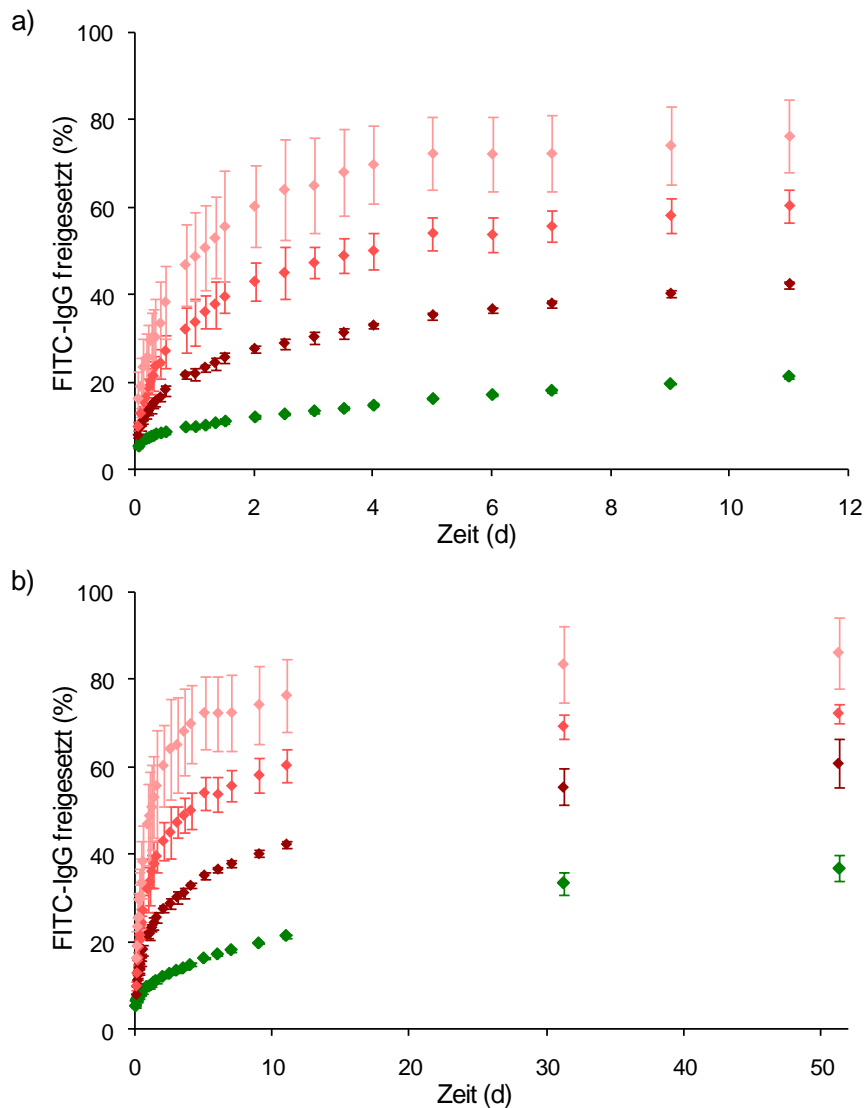


Abb. 57: Freisetzung von FITC-IgG aus PEG-Hydrogelen, zu deren Beladung unterschiedliche Mengen PEG 2000 eingesetzt wurden.

a) Tag 0 bis Tag 11 der Freisetzung

b) komplette Freisetzung über 51 Tage

- ◆ Kontrolle, ohne zusätzliches PEG
- ◆ mit 10% (m/V) zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG 2000 hergestellt
- ◆ mit 20% (m/V) zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG 2000 hergestellt
- ◆ mit 30% (m/V) zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG 2000 hergestellt

2.1.3 Freisetzung von Avastin®

Die in situ-gelierenden PEG-Hydrogele sollten als Drug Delivery System für Avastin® im Glaskörperraum des Auges eingesetzt werden. Daher wurde auch die Freisetzung von Bevacizumab (Avastin®) aus den Gelen bestimmt. Aus den Untersuchungen mit dem fluoreszenzmarkiertem Antikörper ist ersichtlich, dass die 4%igen PEG-Hydrogele die Freisetzung von Antikörpern nicht ausreichend verzögern (siehe Abschnitt 2.1.2). Daher wurden für die Versuche mit Bevacizumab sowohl 4%ige als auch 10%ige PEG-Hydrogele hergestellt. Außerdem erfolgte die Beladung nicht nur mit 30% (m/V) PEG 2000, sondern auch mit 10% (m/V) PEG 10000.

Abb. 58 zeigt das Ergebnis der Freisetzungsuntersuchung mit den 4%igen PEG-Hydrogelen. Die Gele wurden jeweils mit 1,25 mg Bevacizumab beladen, was der derzeitigen Dosis einer einmaligen intravitralen Injektion entspricht. Während die Kontrolle ohne zusätzliches PEG wie erwartet nur eine minimale Menge des Wirkstoffes freisetzt (< 10%), werden aus den beiden anderen Gelen etwa 50% bzw. 70% der inkorporierten Menge freigesetzt.

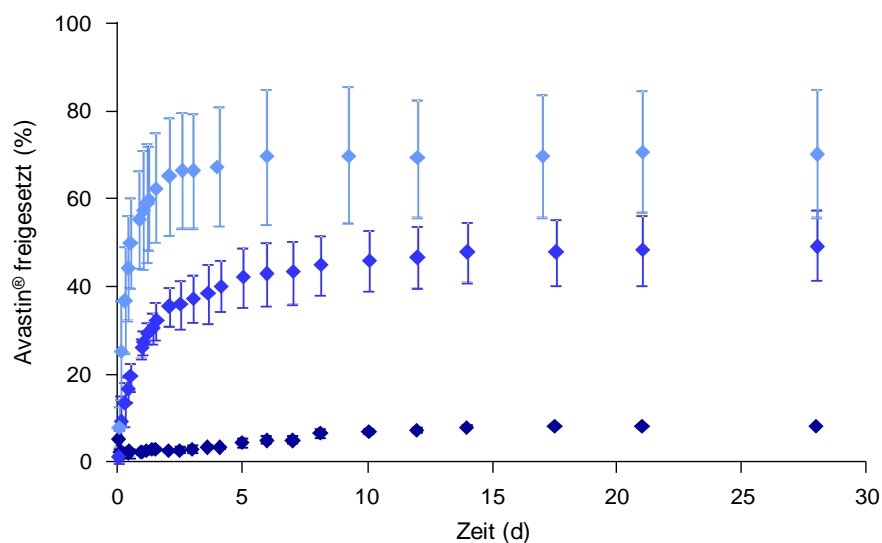


Abb. 58: Freisetzung von Avastin aus 4%igen PEG-Hydrogelen.

- ◆ Kontrolle, ohne zusätzliches PEG
- ◆ mit 30% (m/V) zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG 2000
- ◆ mit 10% (m/V) zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG 10000

Auch bei den 10%igen PEG-Hydrogelen zeigte sich ein ähnliches Bild: Hier setzten die Gele mit zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG etwa 35% bzw. 60% des eingearbeiteten Wirkstoffes frei, in der Kontrollgruppe wurden dagegen nur etwa 10% freigesetzt (siehe Abb. 59). In allen Gruppen endet die Wirkstofffreisetzung innerhalb des untersuchten Zeit-

raumes von 28 Tagen; bei den 4%igen PEG-Hydrogelen ist sie schneller beendet als bei den 10%igen. Außerdem ist sie in den mit zusätzlichem PEG 10000 hergestellten Gelen etwas früher beendet als in denen mit 30% (m/V) zusätzlichem PEG 2000. Am kürzesten war die Freisetzung aus den 4%igen PEG-Hydrogelen mit 10% (m/V) zusätzlichem PEG 10000 (nur etwa fünf Tage). Mit etwa zwei Wochen dauerte sie bei den 10%igen PEG-Hydrogelen mit 30% (m/V) zusätzlichem PEG 2000 am längsten. Allerdings wurden hier nur knapp 40% des Antikörpers freigesetzt.

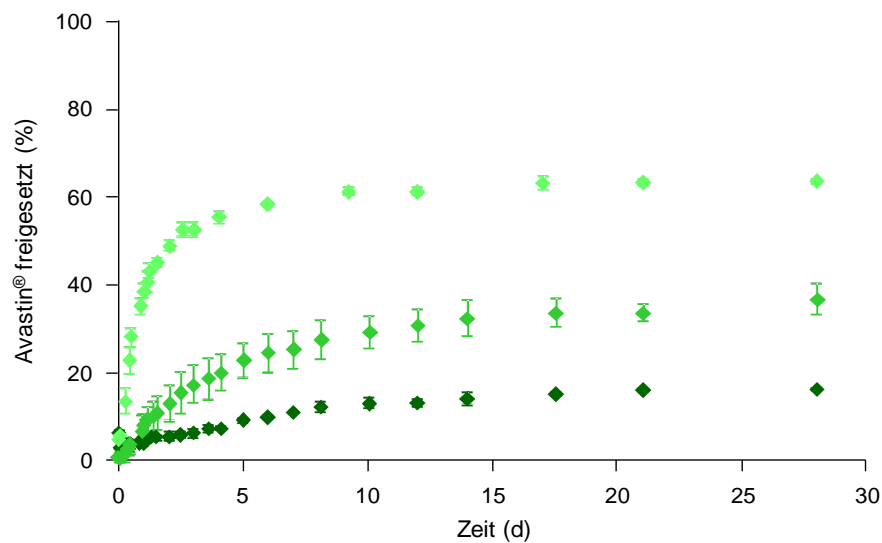


Abb. 59: Freisetzung von Avastin aus 10%igen PEG-Hydrogelen.

- ◆ Kontrolle, ohne zusätzliches PEG
- ◆ mit 30% (m/V) zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG 2000
- ◆ mit 10% (m/V) zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG 10000

Des Weiteren fallen beim Vergleich der beiden Abbildungen 58 und 59 die größeren Standardabweichungen bei den 4%igen PEG-Hydrogelen auf. Die rheologische Untersuchung dieser Gele zeigte, dass beide Gele mit zusätzlichem PEG weniger fest waren als das Gel ohne zusätzliches PEG (vgl. Abb. 60, linke Seite). Zur Herstellung der Gele wurden die Lösungen der beiden Ausgangssubstanzen in Glasringen gemischt, die Gelierung erfolgte anschließend bei 37°C im Trockenschrank. Für die Freisetzungsuntersuchungen wurden die Glasringe entfernt und die Gelzylinder in Glasgefäße gegeben. Weil die Gele mit zusätzlichem PEG-Anteil weniger fest waren, behielten diese dabei ihre Zylinderform nicht bei, was zu der größeren Streuung innerhalb dieser Gruppen führte. Die aus 10% quervernetzbarem PEG hergestellten Gele zeigen zwar auch unterschiedliche Festigkeiten (vgl. Abb. 60, rechte Seite), jedoch liegt das Gel mit der niedrigsten Festigkeit hier noch im Bereich des festesten 4%igen PEG-Hydrogels (ohne zusätzliches PEG). Daher waren diese

Gele auch leichter zu handhaben und behielten ihre Form, was zu der geringeren Streuung führt.

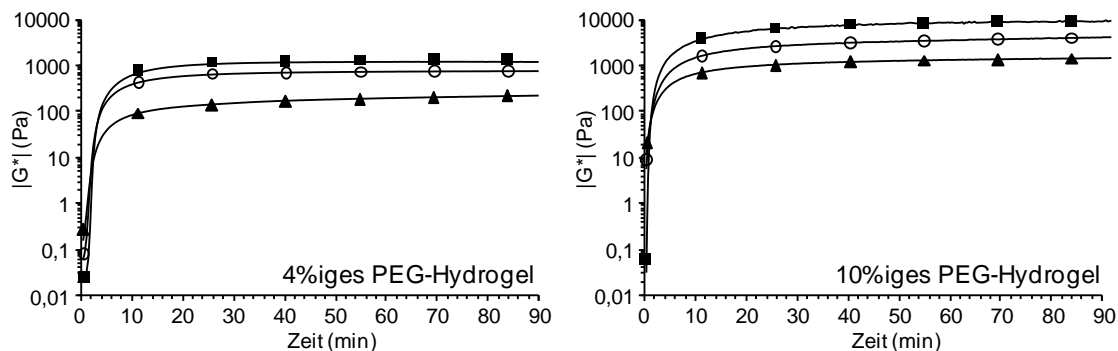


Abb. 60: Rheologische Untersuchung der PEG-Hydrogele mit verschiedenen Anteilen an zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG.

links: 4%iges PEG-Hydrogel

rechts: 10%iges PEG-Hydrogel

■ ohne zusätzliches, nicht-quervernetzbares PEG

▲ mit 30% (m/V) zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG 2000

○ mit 10% (m/V) zusätzlichem, nicht-quervernetzbarem PEG 10000

3. Zusammenfassung

Die Versuche zur Ausfällung von Proteinen mit löslichem PEG zeigten, dass die zur vollständigen Präzipitation der Antikörper benötigte Konzentration stark von der Kettenlänge des verwendeten PEGs abhängt. Mit dem niedermolekularen, flüssigen PEG 400 kann auch mit der hohen Konzentration von 50% (m/V) nur etwa die Hälfte der Antikörper aus der Lösung ausgefällt werden. Dagegen reichen schon etwa 30% (m/V) von PEG 2000 aus, um das gesamte Protein aus der Lösung zu entfernen, von PEG 10000 sogar nur 20% (m/V). Wegen der höheren Viskosität der PEG 10000-Lösung ist aber trotzdem PEG 2000 zu bevorzugen. Die Gelbildung des in situ-gelierenden PEG-Hydrogels wird durch das zusätzliche, lösliche PEG 2000 leicht beschleunigt, außerdem sind die Gele mit zusätzlichem PEG 2000 weniger fest als die reinen PEG-Hydrogele.

Die durch Zugabe von löslichem PEG ausgefällten Antikörper wurden nicht kovalent in das Polymergerüst des Gels eingebunden, wie die Freisetzungsuntersuchungen zeigten. Die jeweiligen Gele setzten die ausgefällten Proteine relativ schnell frei, während die Gele ohne PEG-Zusatz die fluoreszenzmarkierten Antikörper nur in sehr geringem Maße freigaben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die absolut freigesetzte Proteinmenge von der zur Präzipitation eingesetzten Menge PEG abhing. Den Wirkstoff Bevacizumab setzten die in situ gelierenden PEG-Hydrogele über einen maximalen Zeitraum von etwa 2 Wochen frei.

Kapitel 8

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

1. Zusammenfassung

Die Keratoconjunctivitis sicca ist eine multifaktorielle Erkrankung der Augenoberfläche, bei der auch die Stabilität des Tränenfilms beeinträchtigt ist [82]. Eine verringerte EGF-Konzentration in der Tränenflüssigkeit von KCS-Patienten führt zu Schäden an der Augenoberfläche [105]. Die Substitution von EGF bei diesen Patienten stellt demnach einen kausalen Therapieansatz dar. Für diese Substitution sind Augentropfen (die wegen ihrer leichten Anwendbarkeit gängigste Darreichungsform für Augenarzneimittel) jedoch nicht geeignet. Sie haben nur eine relativ geringe Verweildauer im Auge, da die applizierte Dosis durch den Tränenfluss schnell verdünnt und ausgespült wird. Für die Therapie mit Wachstumsfaktoren ist aber eine möglichst lange Verweildauer der Peptide an ihrem Rezeptor entscheidend [48]. Daher sollte eine Darreichungsform mit längerer Verweildauer im Auge, wie Augeninserte, entwickelt werden (**Kapitel 1**).

Die Herstellung der Augeninserte auf Alginatbasis wird in **Kapitel 3** beschrieben. Die Inserte werden aus einer gleichmäßig dicken, quervernetzten und getrockneten Alginatmatrix ausgestanzt. Die Herstellung dieser Matrix erfolgt am einfachsten in einer Teflonschale, damit auch niedrigviskose Alginatlösungen verarbeitet werden können. Die Viskosität der Lösungen ist entscheidend, da Alginat durch Filtration sterilisiert werden müssen; eine Hitzesterilisation führt zu einer Verkürzung der Polysaccharidketten. Zur Quervernetzung der Alginatmatrix wurden zwei Methoden etabliert: die äußere Gelierung durch Diffusion von Ca^{2+} -Ionen und die innere Gelierung, bei der die benötigten Kationen zunächst komplexiert oder als schwerlösliches Salz innerhalb der Alginatlösung vorliegen und erst durch eine Verringerung des pH-Werts frei werden. Beide Methoden führen zu einer relativ festen und spröden Matrix, die jedoch durch einen Zusatz von Glycerol als Weichmacher erheblich flexibler wird.

Die Quervernetzung mittels innerer Gelierung erscheint vorteilhafter, da Quervernetzung und Trocknung hier parallel ablaufen. Die beiden etablierten Methoden zur inneren Gelierung (mit Ca-EDTA-Komplex und mit schwerlöslichem Salz) wurden mittels oszillierender Rheometrie genauer untersucht (**Kapitel 4**). Dabei zeigte sich, dass die Festigkeit der Gele und damit das Ausmaß der Gelierung vor allem vom verwendeten Alginattyp abhängt (je mehr Guluronsäurereste in der Polysaccharidkette sind, desto fester wird das Gel), während die Geschwindigkeit der Quervernetzung von der GDL- und Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst wird. Für die Quervernetzung mit Ca-EDTA und GDL muss die Ausgangslösung zunächst neutralisiert werden, da ansonsten das Alginat nicht darin aufgelöst werden kann. Wie sich

zeigte, kann der pH-Wert aber auch deutlich höher liegen (bis etwa 10), dann dauert die Gelierung jedoch entsprechend länger.

Die Augeninserte sollen sich während der Applikation langsam auflösen, um ihre Anwendung zu erleichtern. Dazu muss die Quervernetzung rückgängig gemacht werden, was durch die Bildung eines stabilen Ca-EDTA-Komplexes geschehen kann (**Kapitel 5**). Zur Herstellung sich langsam lösender Augeninserte muss der Komplexbildner in die Matrix inkorporiert werden, ohne dass die Ca^{2+} -Kationen schon während der Herstellung komplexiert werden. Es zeigte sich, dass ein geschichteter Aufbau der Inserte nicht dazu geeignet war, den Komplexbildner von den Ca^{2+} -Ionen zu trennen, da sich die entsprechenden Inserte in vitro zu schnell wieder auflösten. Durch die Verwendung der schwer löslichen freien Säure ($\text{H}_4\text{-EDTA}$) konnte die Auflösung der Inserte dagegen deutlich verlangsamt werden. Auch durch den direkten Einsatz von Ca-EDTA als Ca^{2+} -Quelle konnten langsam lösliche Augeninserte hergestellt werden. Das Prinzip beruht dabei auf einer vorübergehenden Verringerung der Stabilität des Ca-EDTA-Komplexes während der Herstellung, die durch den neutralen pH-Wert der Tränenflüssigkeit wieder erhöht wird.

Als weiterer wichtiger Faktor wurde die Stabilität des Wirkstoffes EGF während der Herstellung der Augeninserte mittels äußerer und innerer Gelierung untersucht (**Kapitel 6**). Dazu wurde hochreines EGF mit der Alginatlösung gemischt und die entstandenen Abbauprodukte zunächst mittels HPLC detektiert und anschließend anhand von Massenspektren identifiziert. Neben einfach oxidiertem EGF als Hauptabbauprodukt konnten noch desamidiertes und dreifach oxidiertes EGF nachgewiesen werden. Im Vergleich mit den beiden Methoden der inneren Gelierung stellte sich die äußere Gelierung wegen des zweiten Trocknungsschrittes als schlechter geeignet heraus. Wurde dagegen die innere Gelierung angewendet, blieb bei der direkten Verwendung des Ca-EDTA-Komplexes am meisten EGF in unveränderter Form erhalten.

Zur Untersuchung ihrer Freisetzungseigenschaften wurden die erodierbaren Augeninserts zum einen in 5 ml Puffer inkubiert und zum anderen in einer kleinen Durchflusszelle (72 μl) von Puffer umspült (**Kapitel 6**). Mit beiden Apparaturen konnte eine leichte Verzögerung der Freisetzung durch die bei der Herstellung verwendete Alginatmenge und die Kettenlänge des verwendeten Alginats festgestellt werden. Es zeigte sich aber ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Methoden, da die Freisetzung in dem größeren Volumen deutlich schneller erfolgte. Daher sollte die endgültige Bewertung der Augeninserte als Darreichungsform für EGF erst nach einer entsprechenden klinischen Studie erfolgen.

Augentropfen sind auch für die Therapie intraokulärer Erkrankungen weniger geeignet. Hier erschweren die physiologischen Schutzfunktionen der Augen die Resorption der Wirkstoffe. Neben dem Tränenfluss zählen dazu vor allem der Aufbau der Hornhaut und das von innen nach außen fließende Kammerwasser [108]. Zur Therapie solcher Erkrankungen, etwa der altersbedingten Makuladegeneration, werden die Wirkstoffe daher direkt ins Auge injiziert (**Kapitel 1**). Ein intraokuläres Drug Delivery System, das Wirkstoffe wie z.B. Bevacizumab gegen die AMD über einen möglichst langen Zeitraum freisetzt, wäre sinnvoll um die damit verbundenen Risiken und Belastungen zu verringern.

Erste Versuche zur Entwicklung eines intraokulären Drug Delivery Systems werden in **Kapitel 7** beschrieben. Das System basiert auf einem injizierbaren PEG-Hydrogel aus zwei Komponenten, die erst nach ihrer Durchmischung in situ ein Gel ausbilden. Das Gelgerüst wird dabei durch die Reaktion eines PEG-Amins mit einem Amin-reaktiven PEG-Succinimidylester aufgebaut. Um zu verhindern, dass Proteine in das Gelnetzwerk einpolymerisiert werden, können diese mit zusätzlichem, nicht quervernetzbarem PEG ausgefällt werden. Die zur Präzipitation benötigte Menge PEG hängt dabei von der Kettenlänge ab: Je höher das Molekulargewicht, desto weniger PEG wird zur vollständigen Präzipitation benötigt. Durch das zusätzliche PEG wird die Gelierung der PEG-Hydrogele leicht beschleunigt und es bilden sich etwas weniger feste Gele aus. In Freisetzungsuntersuchungen mit Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die freigesetzte Menge Protein von der eingesetzten Menge an löslichem PEG abhängt: Je mehr zusätzliches PEG verwendet wurde, desto mehr Protein wurde freigesetzt. Die Dauer der Freisetzung konnte durch eine höhere Konzentration an gelbildenden Komponenten von einer Woche auf etwa zwei Wochen verlängert werden.

2. Schlussfolgerungen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein Augeninsert zur Behandlung der Keratoconjunctivitis sicca mit EGF entwickelt. Es wurden verschiedene Herstellungsmethoden etabliert, von denen die innere Gelierung mit einem gelösten Ca-EDTA-Komplex als Ca^{2+} -Quelle am geeignetsten erscheint. Vor allem die durch den Wegfall des zweiten Trocknungsschrittes bessere Stabilität des Wirkstoffs ist hier entscheidend. Ein weiterer Vorteil ist, dass sämtliche Bestandteile des Inserts aufgelöst und somit einfach sterilfiltriert werden können. Die mit CaHPO_4 als Ca^{2+} -Quelle entstehende Suspension wäre erheblich schwerer zu sterilisieren. Der Alginatmatrix sollte weiterhin generell 1% Glycerol als Weichmacher zugesetzt werden, damit die Augeninserte flexibler sind und somit vom Auge besser toleriert werden.

Zur abschließenden Bewertung der Augeninserte sollte die bereits geplante Verträglichkeitsstudie mit Placebo-Inserten durchgeführt werden. Damit kann auch gleichzeitig der Nachweis erfolgen, dass sich die Inserte während der Applikation im Auge auflösen. Des Weiteren sollte in einer placebokontrollierten klinischen Studie die Wirksamkeit von EGF bei Keratoconjunctivitis sicca belegt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit der Amin-reaktive, in situ gelierende PEG-Hydrogele mit Proteinen beladen werden können, ohne dass diese in das Gelnetzwerk einpolymerisiert werden. Mit in vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich die eingearbeiteten Proteine bei Kontakt mit Puffer wieder auflösen und aus dem Gel freigesetzt werden. Allerdings erfolgt diese Freisetzung nicht über den gewünschten Zeitraum von mehreren Monaten. Die hier entwickelte Methode zur Beladung des in situ gelierenden PEG-Hydrogels ist somit nicht für eine Verbesserung der gegenwärtigen intravitrealen Therapie mit Anti-VEGF-Antikörpern geeignet.

Um das PEG-Hydrogel dennoch als intraokuläres Drug Delivery System einsetzen zu können, sollten die Antikörper in Zukunft gezielt an die Komponenten des Gels angebunden werden, ohne dass sie dabei ihre Wirksamkeit verlieren. Die Anbindung sollte so gestaltet sein, dass die Antikörper in vivo von dem Gelgerüst abgespaltet werden und zum Wirkort diffundieren können. Das könnte zum Beispiel durch einen entsprechenden bioabbaubaren Linker geschehen oder durch ein enzymatisch spaltbares PEG-Hydrogel, dass sich langsam im Auge auflöst und dabei den Wirkstoff freisetzt.

Literaturverzeichnis

-
- [1] Abdelsalam, A., Del Priore, L., Zarbin, M. A. "Drusen in age-related macular degeneration: pathogenesis, natural course, and laser photocoagulation-induced regression". *Survey of Ophthalmology* (1999) **44**: 1-29.
- [2] Amsden, B., Turner, N. "Diffusion characteristics of calcium alginate gels". *Biotechnology and Bioengineering* (1999) **65**: 605-610.
- [3] Atha, D. H., Ingham, K. C. "Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume". *The Journal of Biological Chemistry* (1981) **256**: 12108-12117.
(<http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/256/23/12108>)
- [4] Barnes, H. A., Hutton, J. F., Walters, K. "An introduction to rheology". Elsevier, Amsterdam. 5. Auflage (1997).
- [5] Baudouin, C. "The Pathology of Dry Eye". *Survey of Ophthalmology, Supplement 2* (2001) **45**: S211-S220.
- [6] Bauer, K. H., Frömming, K.-H., Führer, C. "Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie". Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart. 6. Auflage (1999).
- [7] Bawa, R. "Ocular Inserts". In Ashim K. Mitra (Hg.) *Ophthalmic Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker, New York (1993): 223-260.
- [8] Bertram, B., Bartz-Schmidt, K. U., Birngruber, R. et al. "Aktuelle therapeutische Möglichkeiten bei der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration – Stellungnahme der Retinologischen Gesellschaft, der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands zu aktuellen therapeutischen Möglichkeiten bei der neovaskulären altersbedingten Makuladegeneration". *Der Ophthalmologe* (2007) **104**: 628-634.
(doi:10.1007/s00347-007-1581-2)
- [9] Blaschek, W., Hager, H. H. J. "Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen". Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft [u.a.], Stuttgart. 6. Auflage (2007).
- [10] Brandl, F., Henke, M., Rothschenk, S. et al. "Poly(ethyleneglycol) based hydrogels for intraocular applications". *Advanced Engineering Materials* (2007) **9**: 1141-1149.
(doi:10.1002/adem.200700221)
- [11] Brandl, F., Rothschenk, S., Blaimer, A. et al. "In situ-forming hydrogels for intraocular drug delivery". 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona, Spanien (2008).
- [12] Brignole, F., Pisella, P. J., Goldschild, M. et al. "Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells of patients with dry eyes". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (2000) **41**: 1356-1363.
- [13] Bron, A. J. "The Doyne Lecture. Reflections on the tears". *Eye* (1997) **11**: 583-602.
- [14] Bron, A. J., Tiffany, J. M. "The contribution of meibomian disease to dry eye". *The Ocular Surface* (2004) **2**: 149-165.
- [15] Bron, A. J., Smith, J. A., Calonge, M. "Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007)". *The Ocular Surface* (2007) **5**: 108-152.

-
- [16] Brown, D. M., Regillo, C. D. "Anti-VEGF agents in the treatment of neovascular age-related macular degeneration: applying clinical trial results to the treatment of everyday patients". *American Journal of Ophthalmology* (2007) **144**: 627-637. (doi:10.1016/j.ajo.2007.06.039)
- [17] Burns, E., Mulley, G. P. "Practical Problems with Eye-drops Among Elderly Ophthalmology Outpatients". *Age and Ageing* (1992) **21**: 168-170. (doi:10.1093/ageing/21.3.168)
- [18] Calabria, G., Rathschuler, F. "Contact Lenses as Therapeutic Systems". In Marco F. Saettone (Hg.) *Ophthalmic Drug Delivery*. Liviana Press, Padova (1987).
- [19] Calnan, D. P., Fagbemi, A., Berlanga-Acosta, J. et al. "Potency and stability of C terminal truncated human epidermal growth factor". *Gut* (2000) **47**: 622-627. (doi: 10.1136/gut.47.5.622)
- [20] Carpenter, G., Cohen, S. "Epidermal Growth Factor". *Annual Review of Biochemistry* (1979) **48**: 193-216. (doi:10.1146/annurev.bi.48.070179.001205)
- [21] Carpenter, G., Cohen, S. "Epidermal growth factor". *The Journal of Biological Chemistry* (1990) **265**: 7709-7712.
- [22] Cohen, S., Carpenter, G. "Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1975) **72**: 1317-1321.
- [23] Combes, C. L., Birch, G. G. "Interaction of D-Glucono-1,5-Lactone with Water". *Food Chemistry* (1988) **27**: 283-298.
- [24] Creighton, T. E. "Proteins – Structures and molecular properties". Freeman, New York. 2. Auflage (1993).
- [25] Dartt, D. A. "Regulation of Lacrimal Gland Secretion by Neurotransmitters and the EGF Family of Growth Factors". *Experimental Eye Research* (2001) **73**: 741-752.
- [26] de Jong, P. T. V. M. "Age-Related Macular Degeneration". *The New England Journal of Medicine* (2006) **355**: 1474-1485. (doi:10.1056/NEJMra062326)
- [27] DiAugustine, R. P., Gibson, B. W., Aberth, W. et al. "Evidence for Isoaspartyl (Deamidated) Forms of Mouse Epidermal Growth Factor". *Analytical Biochemistry* (1987) **165**: 420-429.
- [28] Dick, J. S. "Macular edema". *International Ophthalmology Clinics* (1999) **39**: 1-18.
- [29] Dolder, R., Skinner, F. S. "Ophtalmika". Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Zürich, Basel, Mainz. 4. Auflage (1990).
- [30] Draget, K. I., Smidsrod, O., Skjak-Braek, G. "Alginates from Algae". In Sophie de Baets et al. (Hg.) *Biopolymers*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (2002): 215-244.
- [31] Ehlers, E. "Analytik II – Kurzlehrbuch". Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart. 11. Auflage (2008).
- [32] "Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, 5. Nachtrag – Amtliche Deutsche Ausgabe". Deutscher Apotheker Verlag, Govi-Verlag, Stuttgart, Eschborn (2006).

-
- [33] Fagerson, I. S. "Thermal Degradation of Carbohydrates. A Review". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1969) **17**: 747-750.
(doi:10.1021/jf60164a019)
- [34] "Protan-Alginat – Einführung". Firma Protan, Norwegen (Hg.).
- [35] Friedman, D. S., O'Colmain, B. J., Muñoz, B. et al. "Prevalence of age-related macular degeneration in the United States". *Archives of Ophthalmology* (2004) **122**: 564-572.
(doi:10.1001/archopht.122.4.564)
- [36] Fuchs-Koelwel, B., Koelwel, C., Göpferich, A. et al. "Verträglichkeit eines neuen Kalzium-Alginat-Insertes zur kontrollierten medikamentösen Therapie am Auge". *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* (2004) **101**: 496-499.
(doi:10.1007/s00347-003-0901-4)
- [37] Gehm, L. "Rheologie – Praxisorientierte Grundlagen und Glossar". Vincentz, Hannover (1998).
- [38] George-Nascimento, C., Gyenes, A., Halloran, S. M. et al. "Characterization of Recombinant Human Epidermal Growth Factor Produced in Yeast". *Biochemistry* (1988) **27**: 797-802.
(doi:10.1021/bi00402a046)
- [39] Geroski, D. H., Edelhauser, H. F. "Transscleral drug delivery for posterior segment disease". *Advanced Drug Delivery Reviews* (2001) **52**: 37-48.
(doi:10.1016/S0169-409X(01)00193-4)
- [40] Gey, M. H. "Instrumentelle Analytik und Bioanalytik – Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen". Springer, Berlin, Heidelberg. 2. Auflage (2008).
- [41] Goodlad, R. A., Boulton, R., Playford, R. J. "Comparison of the mitogenic activity of human epidermal growth factor I-53 and epidermal growth factor I-48 in vitro and in vivo". *Clinical Science* (1996) **91**: 503-507.
- [42] Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A. et al. "Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model". *FEBS Letters* (1973) **32**: 195-198.
- [43] Gregory, H., Thomas, C. E., Young, J. A. et al. "The contribution of the C-terminal undecapeptide sequence of urogastrone-epidermal growth factor to its biological action". *Regulatory Peptides* (1988) **22**: 217-226.
- [44] Grehn, F. "Augenheilkunde". Springer, Berlin, Heidelberg. 29. Auflage (2006).
- [45] Grunwald, J. E., Hariprasad, S. M., DuPont, J. "Effect of Aging on Foveolar Choroidal Circulation". *Archives of Ophthalmology* (1998) **116**: 150-154.
(doi:10.1001/archopht.116.2.150)
- [46] Haesslein, A., Ueda, H., Hacker, M. C. et al. "Long-term release of fluocinolone acetonide using biodegradable fumarate-based polymers". *Journal of Controlled Release* (2006) **114**: 251-260.
(doi:10.1016/j.jconrel.2006.05.024)

-
- [47] Hageman, G. S., Luthert, P. J., Victor Chong, N. H. et al. "An Integrated Hypothesis That Considers Drusen as Biomarkers of Immune-Mediated Processes at the RPE-Bruch's Membrane Interface in Aging and Age-Related Macular Degeneration". *Progress in Retinal and Eye Research* (2001) **20**: 705-732.
- [48] Haigler, H. T., Cohen, S. "Epidermal growth factor-interactions with cellular receptors". *Trends in Biochemical Sciences* (1979) **4**: 132-134.
(doi:10.1016/0968-0004(79)90444-4)
- [49] Haskó, F., Vaszileva, R., Halász, L. "Solubility of Plasma Proteins in the Presence of Polyethylene Glycol". *Biotechnology and Bioengineering* (1982) **24**: 1931-1939.
(doi:10.1002/bit.260240902)
- [50] Haugland, R. P. "The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies". Invitrogen Molecular Probes (Hg.).
(<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Fluorophores-and-Their-Amine-Reactive-Derivatives/Introduction-to-Amine-Modification.html>)
- [51] Heiduschka, P., Fietz, H., Hofmeister, S. et al. "Penetration of Bevacizumab through the Retina after Intravitreal Injection in the Monkey". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (2007) **48**: 2814-2823.
(doi:10.1167/iovs.06-1171)
- [52] Hill, J. M., O'Callaghan, R. J., Hobden, J. A. et al. "Corneal Collagen Shields for Ocular Drug Delivery". In Ashim K. Mitra (Hg.) *Ophthalmic Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker, New York (1993): 261-273.
- [53] Hori, K., Sotozono, C., Hamuro, J. et al. "Controlled-release of epidermal growth factor from cationized gelatin hydrogel enhances corneal epithelial wound healing". *Journal of Controlled Release* (2007) **118**: 169-176.
- [54] Hughes, P. M., Olejnik, O., Chang-Lin, J.-E. et al. "Topical and systemic drug delivery to the posterior segments". *Advanced Drug Delivery Reviews* (2005) **57**: 2010-2032.
(doi:10.1016/j.addr.2005.09.004)
- [55] Hunnius, C., Burger, A. "Hunnius pharmazeutisches Wörterbuch". de Gruyter, Berlin. 8. Auflage (1998).
- [56] Ibrahim, H., Buri, P., Gurny, R. "[Composition, structure and physiologic parameters of the lacrimal system; implications for the concept of ophthalmic forms]". *Pharmaceutica acta Helvetiae* (1988) **63**: 146-154.
- [57] Imanishi, J., Kamiyama, K., Iguchi, I. et al. "Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea". *Progress in Retinal and Eye Research* (2000) **19**: 113-129.
- [58] Ingham, K. C. "Protein precipitation with polyethylene glycol". In William B. Jakoby (Hg.) *Methods in Enzymology: Part C: Enzyme Purification and Related Techniques*. Academic Press (1984): 351-356.
- [59] Jager, R. D., Aiello, L. P., Patel, S. C. et al. "Risks of intravitreal injection: a comprehensive review". *Retina* (2004) **24**: 676-698.
- [60] Jager, R. D., Mieler, W. F., Miller, J. W. "Age-Related Macular Degeneration – Medical Progress". *The New England Journal of Medicine* (2008) **358**: 2606-2617.
(doi:10.1056/NEJMr0801537)

- [61] Johnson, M. E., Murphy, P. J. "Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome". *Progress in Retinal and Eye Research* (2004) **23**: 449-474. (doi:10.1016/j.preteyeres.2004.04.003)
- [62] Jonas, J. B., Spandau, U. H., Schlichtenbrede, F. "Short-term complications of intravitreal injections of triamcinolone and bevacizumab". *Eye* (2008) **22**: 590-591. (doi:10.1038/eye.2008.10)
- [63] Joussen, A. M. "Molekulare Pathogenese vaskulärer Erkrankungen des Auges - Anti-Angiogenese als Therapiekonzept". *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946) (2007) **132**: 1268-1272. (doi:10.1055/s-2007-982025)
- [64] Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. "Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler". Thieme, Stuttgart. 14. Auflage (1994).
- [65] Klaassen-Broekema, N., Mackor, A. J., van Bijsterveld, O. P. "The diagnostic power of the tests for tear gland related keratoconjunctivitis sicca". *The Netherlands Journal of Medicine* (1992) **40**: 113-116.
- [66] Klein, R., Klein, B. E. K., Tomany, S. C. et al. "Ten-Year Incidence and Progression of Age-related Maculopathy – The Beaver Dam Eye Study". *Ophthalmology* (2002) **109**: 1767-1779.
- [67] Klenkler, B., Sheardown, H., Jones, L. "Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing, and ocular pathology". *The Ocular Surface* (2007) **5**: 228-239.
- [68] Kocur, I., Resnikoff, S. "Visual impairment and blindness in Europe and their prevention". *The British Journal of Ophthalmology* (2002) **86**: 716-722.
- [69] Koelwel, C. "Entwicklung von EGF-beladenen Ca-Alginat-Inserten zur kausalen Behandlung des „trockenen“ Auges". *Dissertation*. Ernst-Moritz-Arndt-Universität (Hg.) (2003). (<http://ub-ed.ub.uni-greifswald.de/opus/volltexte/2006/192/>)
- [70] Koelwel, C., Rothschenk, S., Fuchs-Koelwel, B. et al. "Alginate Inserts Loaded with Epidermal Growth Factor for the Treatment of Keratoconjunctivitis Sicca". *Pharmaceutical Development and Technology* (2008) **13**: 221-231. (doi:10.1080/10837450801949566)
- [71] Kulkarni, A. D., Kuppermann, B. D. "Wet age-related macular degeneration". *Advanced Drug Delivery Reviews* (2005) **57**: 1994-2009. (doi:10.1016/j.addr.2005.09.003)
- [72] Kulkarni, S. P., Bhanumathi, B., Thoppil, S. O. et al. "Dry Eye Syndrome". *Drug Development and Industrial Pharmacy* (1997) **23**: 465-471.
- [73] Lamoreaux, W. J., Fitzgerald, M. E. C., Reiner, A. et al. "Vascular Endothelial Growth Factor Increases Release of Gelatinase A and Decreases Release of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases by Microvascular Endothelial Cells in Vitro". *Microvascular Research* (1998) **55**: 29-42.
- [74] Lapasin, R., Prich, S. "Rheology of industrial polysaccharides – Theory and applications". Blackie Acad. & Professional, London. 1. Auflage (1995).
- [75] Lawrence, M. S., Miller, J. W. "Ocular Tissue Permeabilities". *International Ophthalmology Clinics* (2004) **44**: 53-61.

-
- [76] Lee, D. A., Leong, K. W. "Medicated Bioerodible Ophthalmic Devices". In Michael Szycher (Hg.) *High Performance Biomaterials*. Technomic Publishing Company, Lancaster (1991): 733-742.
- [77] Lemp, M. A. "Breakup of the tear film". *International Ophthalmology Clinics* (1973) **13**: 97-102.
- [78] Lemp, M. A. "Report of the National Eye Institute/Industry Workshop on Clinical Trials in Dry Eyes". *The CLAO Journal: Official Publication of the Contact Lens Association of Ophthalmologists* (1995) **21**: 221-232.
- [79] Lemp, M. A. "Epidemiology and Classification of Dry Eye". In David A. Sullivan (Hg.) *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 2*. Plenum Press, New York (1998): 791-803.
- [80] Lemp, M. A. "The 1998 Castroviejo Lecture. New strategies in the treatment of dry-eye states". *Cornea* (1999) **18**: 625-632.
- [81] Lemp, M. A., Hamill, J. R. "Factors affecting tear film breakup in normal eyes". *Archives of Ophthalmology* (1973) **89**: 103-105.
- [82] Lemp, M. A. "The Definition and Classification of Dry Eye Disease – Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007)". *The Ocular Surface* (2007) **5**: 75-92.
- [83] Lemp, M. A., Wolfley, D. E. "The Lacrimal Apparatus". In William M. Hart *et al.* (Hg.) *Adler's Physiology of the Eye*. Mosby Year Book, St. Louis, ed. 9 (1992): 18-28.
- [84] Leo, W. J., McLoughlin, A. J., Malone, D. M. "Effects of Sterilization Treatments on Some Properties of Alginate Solutions and Gels". *Biotechnology Progress* (1990) **6**: 51-53.
- [85] Leonard N. Bell. "Peptide Stability in Solids and Solutions". *Biotechnology Progress* (1997) **13**: 342-346.
(doi:10.1021/bp970057y)
- [86] LeRoux, M. A., Guilak, F., Setton, L. A. "Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration". *Journal of Biomedical Materials Research* (1999) **47**: 46-53.
- [87] Lim, J. I. "Subretinal Hemorrhage". *International Ophthalmology Clinics* (1995) **35**: 95-104.
- [88] Liu, Z., Carvajal, M., Carraway, C. A. et al. "Expression of the receptor tyrosine kinases, epidermal growth factor receptor, ErbB2, and ErbB3, in human ocular surface epithelia". *Cornea* (2001) **20**: 81-85.
- [89] Löffler, G. "Basiswissen Biochemie – mit Pathobiochemie". Springer Medizin Verlag, Berlin, Heidelberg. 6. Auflage (2005).
- [90] Löffler, G., Heinrich, P. C., Petrides, P. E. "Biochemie und Pathobiochemie". Springer Medizin Verlag, Berlin, Heidelberg. 8. Auflage (2007).
- [91] Lottspeich, F., Zorbas, H. (Hg.). "Bioanalytik". Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin (1998).
- [92] Macosko, C. W. "Rheology – Principles, Measurements, and Applications". VCH, New York (1994).

- [93] Malvern Instruments Ltd. (Hg.). "Characterising Gel Samples - Gel Strength Determinations".
(www.malvern.co.uk)
- [94] Manning, M. C., Patel, K., Borchardt, R. T. "Stability of Protein Pharmaceuticals". *Pharmaceutical Research* (1989) **6**: 903-918.
- [95] Margrain, T. H., Boulton, M., Marshall, J. et al. "Do blue light filters confer protection against age-related macular degeneration?". *Progress in Retinal and Eye Research* (2004) **23**: 523-531.
(doi:10.1016/j.preteyeres.2004.05.001)
- [96] Martinsen, Storrø, Skjærk-Bræk. "Alginate as immobilization material: III. Diffusional properties". *Biotechnology and Bioengineering* (1992) **39**: 186-194.
(doi:10.1002/bit.260390210)
- [97] Massague, J., Pandiella, A. "Membrane-Anchored Growth Factors". *Annual Review of Biochemistry* (1993) **62**: 515-541.
(doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.002503)
- [98] May, T. B., Chakrabarty, A. M. "Isolation and assay of *Pseudomonas aeruginosa* alginate". In Virginia L. Clark and Patrik M. Bavoil (Hg.) *Methods in Enzymology: Bacterial Pathogenesis Part A: Identification and Regulation of Virulence Factors*. Academic Press (1994): 295-304.
- [99] Miller-Chou, B. A., Koenig, J. L. "A review of polymer dissolution". *Progress in Polymer Science* (2003) **28**: 1223-1270.
- [100] Moshfeghi, A. A., Peyman, G. A. "Micro- and Nanoparticulates". *Advanced Drug Delivery Reviews* (2005) **57**: 2047-2052.
(doi:10.1016/j.addr.2005.09.006)
- [101] Motiejunaite, R., Kazlauskas, A. "Pericytes and ocular diseases". *Experimental Eye Research* (2008) **86**: 171-177.
- [102] Myrvold, R., Onsøyen, E. "Alginates". FMC BioPolymer (Hg.).
(http://www.fmcbiopolymer.com/Portals/Pharm/Content/Docs/PS/16_Alginate.pdf)
- [103] Nobel Foundation (Hg.). "Nobelprize.org".
(<http://nobelprize.org>)
- [104] Oh, H., Takagi, H., Takagi, C. et al. "The Potential Angiogenic Role of Macrophages in the Formation of Choroidal Neovascular Membranes". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (1999) **40**: 1891-1898.
(<http://www.iovs.org/cgi/content/abstract/40/9/1891>)
- [105] Ohashi, Y., Ishida, R., Kojima, T. et al. "Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome". *American Journal of Ophthalmology* (2003) **136**: 291-299.
- [106] Painter, T. J. "Algal Polysaccharides". In Gerald O. Aspinall (Hg.) *The Polysaccharides*. Academic Press, New York (1983): 195-285.
- [107] Pauleikhoff, D., Bornfeld, N., Gabel, V. P. et al. "Konsenspapier der Retinologischen Gesellschaft, der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte - Stellungnahme zur aktuellen Therapie der neovaskulären AMD". *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* (2005): 381-388.
(doi:10.1055/s-2005-858225)

- [108] Pfeifer, S., Pflugel, P., Borchert, H.-H. et al. "Biopharmazie – Pharmakokinetik, Bioverfügbarkeit, Biotransformation". Ullstein Mosby, Berlin. 3. Auflage (1995).
- [109] Pflugfelder, S. C. "Tear fluid influence on the ocular surface". *Advances in Experimental Medicine and Biology* (1998) **438**: 611-617.
- [110] Pflugfelder, S. C., Jones, D., Ji, Z. et al. "Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca". *Current Eye Research* (1999) **19**: 201-211.
- [111] Pflugfelder, S. C., Solomon, A., Stern, M. E. "The diagnosis and management of dry eye: a twenty-five-year review". *Cornea* (2000) **19**: 644-649.
- [112] Pharmazeutische Zeitung online (Hg.). "Neue Arzneistoffe - Verteporfin". (www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=470)
- [113] Plazonnet, B. "Ophthalmic Drug Delivery". In Michael J. Rathbone *et al.* (Hg.) *Modified-release Drug Delivery Technology*. Marcel Dekker, New York, NY (2003): 289-313.
- [114] Rajpal, G., Wu, T., Zivanovic, S. "Mechanism of color development in chitosan films". 231st ACS National Meeting, Atlanta, USA (2006).
- [115] Reddy, I. K., Ganesan, M. G. "Ocular Therapeutics and Drug Delivery: An Overview". In Indra K. Reddy (Hg.) *Ocular Therapeutics and Drug Delivery*. Technomic Publishing Company, Lancaster, Pa. (1996): 3-29.
- [116] Roberts, D. K. "Keratoconjunctivitis sicca". *Journal of the American Optometric Association* (1991) **62**: 187-199.
- [117] "Roche-Lexikon Medizin". Urban & Schwarzenberg, München. 4. Auflage (1999).
- [118] Roos, E., Maile, K., Roos-Maile. "Werkstoffkunde für Ingenieure – Grundlagen, Anwendung, Prüfung". Springer, Berlin. 2. Auflage (2005).
- [119] Saettone, M. F. "Solid Polymeric Inserts/Disks as Drug Delivery Devices". In Peter Edman (Hg.) *Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery*. CRC Press, Boca Raton (1993): 61-79.
- [120] Saettone, M. F., Salminen, L. "Ocular inserts for topical delivery – Ocular Drug Delivery". *Advanced Drug Delivery Reviews* (1995) **16**: 95-106.
- [121] Sarks, S. H., Arnold, J. J., Killingsworth, M. C. et al. "Early drusen formation in the normal and aging eye and their relation to age related maculopathy: a clinicopathological study". *The British Journal of Ophthalmology* (1999) **83**: 358-368.
- [122] Schirra, F., Ruprecht, K. W. "Das trockene Auge". *Der Ophthalmologe* (2004) **101**: 10-18.
(doi:10.1007/s00347-003-0958-0)
- [123] Senderoff, R. I., Wootton, S. C., Boctor, A. M. et al. "Aqueous stability of human epidermal growth factor 1-48". *Pharmaceutical Research* (1994) **11**: 1712-1720.
- [124] Shell, J. W. "Ophthalmic drug delivery systems". *Survey of Ophthalmology* (1984) **29**: 117-128.
- [125] Silbernagl, S., Despopoulos, A. "DTV-Atlas der Physiologie – Tafeln und Texte zu den Funktionen des menschlichen Körpers". Thieme [u.a.], Stuttgart. 2. Auflage (1983).

- [126] Skjak-Braek, G., Grasdalen, H., Draget, K. I. et al. "Inhomogeneous Calcium Alginate Beads". In Vittorio Crescenzi *et al.* (Hg.) *Biomedical and Biotechnological Advances in Industrial Polysaccharides*. Gordon and Breach, New York (1989): 345-363.
- [127] Smidsrød, O., Skjak-Brk, G. "Alginate as immobilization matrix for cells". *Trends in Biotechnology* (1990) **8**: 71-78.
- [128] Smith, J. A. "The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007)". *The Ocular Surface* (2007) **5**: 93-107.
- [129] Stanley Cohen. "Der epidermale Wachstumsfaktor (Nobel-Vortrag)". *Angewandte Chemie* (1987) **99**: 738-744.
(doi:10.1002/ange.19870990805)
- [130] Stern, M. E., Beuerman, R. W., Fox, R. I. et al. "A unified theory of the role of the ocular surface in dry eye". In David A. Sullivan (Hg.) *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 2*. Plenum Press, New York (1998): 643-651.
- [131] Stern, M. E., Gao, J., Siemasko, K. F. et al. "The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye – Special issue in honour of David Maurice". *Experimental Eye Research* (2004) **78**: 409-416.
- [132] Studart, A. R., Pandolfelli, V. C., Tervoort, E. et al. "In Situ Coagulation of High-Alumina Zero-Cement Refractory Castables". *Journal of the American Ceramic Society* (2002) **85**: 1947-1953.
(doi:10.1111/j.1151-2916.2002.tb00386.x)
- [133] Swiss Institute of Bioinformatics (Hg.). "SwissProt Protein knowledgebase".
(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html> / <http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam1?P01133@971-1023@>)
- [134] Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P. et al. "Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen". Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart. 5. Auflage (1999).
- [135] Tong, J.-P., Yao, Y.-F. "Contribution of VEGF and PEDF to choroidal angiogenesis: A need for balanced expressions". *Clinical Biochemistry* (2006) **39**: 267-276.
- [136] Tsubota, K. "New approaches to dry-eye therapy". *International Ophthalmology Clinics* (1994) **34**: 115-128.
- [137] Tsubota, K. "Tear dynamics and dry eye". *Progress in Retinal and Eye Research* (1998) **17**: 565-596.
- [138] Tsubota, K., Nakamori, K. "Dry Eyes and Video Display Terminals". *The New England Journal of Medicine* (1993) **328**: 584.
- [139] Vandenbossche, G. M., Remon, J. P. "Influence of the sterilization process on alginate dispersions". *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* (1993) **45**: 484-486.
- [140] Wee, Gombotz. "Protein release from alginate matrices". *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) **31**: 267-285.
- [141] Weidman, T. A. "Fine Structure and Function of Ocular Tissues. The Retina". *International Ophthalmology Clinics* (1973) **13**: 205-227.
- [142] Wells, A. "EGF receptor". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (1999) **31**: 637-643.

- [143] Wilson, S. E. "Lacrimal gland epidermal growth factor production and the ocular surface". *American Journal of Ophthalmology* (1991) **111**: 763-765.
- [144] Yasukawa, T., Kimura, H., Tabata, Y. et al. "Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery". *Advanced Drug Delivery Reviews* (2001) **52**: 25-36. (doi:10.1016/S0169-409X(01)00192-2)
- [145] Yasukawa, T., Ogura, Y., Kimura, H. et al. "Drug delivery from ocular implants". *Expert Opinion on Drug Delivery* (2006) **3**: 261-273. (doi:10.1517/17425247.3.2.261)
- [146] Yasukawa, T., Ogura, Y., Sakurai, E. et al. "Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices". *Advanced Drug Delivery Reviews* (2005) **57**: 2033-2046. (doi:10.1016/j.addr.2005.09.005)
- [147] Young, R. W., Bok, D. "Participation of the Retinal Pigment Epithelium in the Rod Outer Segment Renewal Process". *The Journal of Cell Biology* (1969) **42**: 392-403. (doi:10.1083/jcb.42.2.392)
- [148] Zarbin, M. A. "Current Concepts in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration". *Archives of Ophthalmology* (2004) **122**: 598-614. (doi:10.1001/archophth.122.4.598)

Anhang

Liste der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADDE	Aqueous-deficient dry eye (Form des trockene Auges, die durch einen Mangel an wässriger Tränenschicht bedingt ist)
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
BSA	Bovine Serum Albumin (Serumalbumin vom Rind)
BUT	Break-up Time (Zeit bis zum Aufreißen des Tränenfilms)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CNV	Chorioidale Neovaskularisation
C-Terminus	Carboxylterminus eines Proteins oder Peptids
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
ECM	Extracellular matrix (Extrazellulärmatrix)
EDE	Evaporative dry eye (Form des trockenen Auges, die durch vermehrtes Verdunsten der wässrigen Tränenschicht bedingt ist)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
E-Modul	Elastizitätsmodul
engl.	Englisch
et al.	und andere
EuAB	Europäisches Arzneibuch
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	Guluronsäure
G'	Speichermodul bei rheologischen Messungen
G''	Verlustmodul bei rheologischen Messungen
G*	Komplexes Modul bei rheologischen Messungen
GDL	Glucono- δ -lacton
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guanin-Nucleotid-bindendes Protein

GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2 (ein Adapterprotein in der Signaltransduktion des EGF-Rezeptors)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₄ -EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
IEP	Isoelektrischer Punkt (eines Proteins)
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KCS	Keratoconjunctivitis sicca
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge
$\lambda_{\text{em.}}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{\text{ex.}}$	Anregungswellenlänge
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (Kopplung von Flüssigchromatographie mit einem Massenspektrometer)
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoprotein mit niedriger Dichte)
LF10/60	Typenbezeichnung der Firma FMC BioPolymers für ein mittelviskoses Alginat mit hohem Guluronsäure-Anteil
LF10/60LS	Typenbezeichnung der Firma FMC BioPolymers für ein mittelviskoses Alginat mit niedrigem Guluronsäure-Anteil
LF200S	Typenbezeichnung der Firma FMC BioPolymers für ein hochviskoses Alginat mit hohem Guluronsäure-Anteil
M	Mannuronsäure
m/z	Quotient aus Masse und Ladung eines Moleküls
MALDI-TOF	Matrix assisted Laser desorption/ionisation - Time of flight (Massenspektroskopische Methode, bei der der Analyt mittels Laserlicht ionisiert wird und die Auftrennung nach der Masse anhand der Flugzeit der unterschiedlich schweren Moleküle erfolgt)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
mg	Milligramm
min	Minute
μl	Mikroliter

µm	Mikrometer
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
Na ₂ -EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
NGF	Nerve Growth Factor (Nervenwachstumsfaktor)
Pa	Pascal
PDT	Photodynamische Therapie
PEG	Polyethylenglykol
PI3-K	Phosphatidylinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PLC _γ	Phospholipase C _γ
PLGA	Poly (lactic-co-glycolic acid) (Kopolymer aus Milch- und Glykolsäure)
R ²	Bestimmtheitsmaß
Raf	Rat fibrosarcoma (eine Serin/Threoninkinase, die als erste Kinase innerhalb der durch EGF aktivierten „Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskade“ aktiviert wird)
Ras	Rat sarcoma (ein kleines G-Protein, das am Anfang der durch EGF aktivierten „Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskade“ steht)
RPE	Retinales Pigmentepithel
Rz.	Retentionszeit
s	Sekunde
s.	siehe
s.a.	siehe auch
s.u.	siehe unten
Shc	Src homologous and collagen-like protein (ein Adapterprotein in der Signaltransduktion des EGF-Rezeptors)
SOS	Son of sevenless (ein Adapterprotein in der Signaltransduktion des EGF-Rezeptors)
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
vgl.	vergleiche

Lebenslauf

Name: Stefan Rothschenk
Geburtsdatum: 28. Juli 1977
Geburtsort: Limburg an der Lahn
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1984-1988 Grundschule Losheim
1988-1994 Nikolaus von Kues Gymnasium, Bernkastel-Kues
1994-1995 Dover College, Dover, UK
1995-1997 Nikolaus von Kues Gymnasium, Bernkastel-Kues
06/1997 Abitur

Zivildienst

07/1997-7/1998 DRK-Sozialwerk, Werkstätten für Behinderte, Bernkastel-Kues

Hochschulausbildung

10/1998-04/2003 Studium der Pharmazie, Johannes Gutenberg Universität Mainz
05/2004 Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeit

11/2002-03/2003 Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie der Johannes Gutenberg Universität, Mainz
05/2003-10/2003 Praktikum Adler-Apotheke, Mainz
11/2003-04/2004 Praktikum Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach
07/2004-08/2008 Promotion am Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. A. Göpferich
seit 01/2009 LTS Lohmann Therapie Systems AG, Qualitätskontrolle

Publikationen

Patent

Rothschenk, S., Göpferich, A. "Langsam lösliche quervernetzte Matrices zur Verabreichung von Proteinanzneistoffen". Eingereicht beim Deutschen Patent- und Markenamt am 31.03.2008

Veröffentlichungen

Koelwel, C., Rothschenk, S., Fuchs-Koelwel, B., Gabler, B., Lohmann, C. Göpferich, A. "Alginate Inserts Loaded with Epidermal Growth Factor for the Treatment of Keratoconjunctivitis Sicca". *Pharmaceutical Development and Technology* (2008) **13**: 221-231.

Brandl, F., Henke, M., Rothschenk, S., Gschwind, R., Breunig, M., Blunk, T., Tessmar, J., Göpferich, A. "Poly(ethyleneglycol) based hydrogels for intraocular applications". *Advanced Engineering Materials* (2007) **9**: 1141-1149.

Konferenzbeiträge:

Rothschenk, S., Brandl, F., Tessmar, J., Blunk, T., Göpferich, A. "Release of IgG from In-Situ Forming Hydrogels for Intraocular Drug Delivery". 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona, Spain (2008).

Brandl, F., Rothschenk, S., Blaimer, A., Blunk, T., Tessmar, J., Göpferich, A. "In situ-forming hydrogels for intraocular drug delivery". 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona, Spanien (2008).

Rothschenk, S., Tessmar, J., Blunk, T., Göpferich, A.: "Investigation on the Gelation Process of Alginate Solutions Using CaHPO₄ and Gluconic Acid Lactone". 2nd European Congress on Life Science Process Technology, Nürnberg (2007).

Brandl, F., Rothschenk, S., Breunig, M., Tessmar, J., Blunk, T., Göpferich, A. "Polyethylene glycol macromers as building blocks for versatile hydrogels". Biohydrogels, Viareggio, Italien (2007).

Rothschenk, S., Kiermaier, J., Tessmar, J., Blunk, T., Göpferich, A. "Stability of EGF During the Manufacturing Process of Ocular Inserts Made of Alginates". DPhG Joint Meeting, Marburg (2006).

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Achim Göpferich, der meine Arbeit am Lehrstuhl ermöglicht hat. Vielen Dank für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen zur Durchführung der Versuche sowie für die guten Ratschläge zur Gestaltung der Arbeit. Außerdem möchte ich mich ganz besonders für die Möglichkeit bedanken, meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen zu präsentieren.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Torsten Blunk und Herrn Dr. Jörg Teßmar für die vielen konstruktiven Hinweise und hilfreichen Diskussionen nicht nur während der Meetings bedanken. Herrn Dr. Jörg Teßmar gilt zudem mein Dank für die umfassende Unterstützung bei der Einarbeitung in die HPLC-Analytik.

Herrn Josef Kiermaier danke ich für die Durchführung der LC/MS-Messungen sowie für die Unterstützung bei deren Auswertung. Für die Hilfe bei den MALDI-ToF-Untersuchungen bedanke ich mich bei Frau Angelika Berié, Herrn Prof. Dr. Rainer Deutzmann und Herrn Eduard Hochmuth.

Für die finanzielle Unterstützung der Arbeit möchte ich mich bei Pharma Stulln GmbH und der Bayerischen Forschungstiftung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt:

- Ferdinand Brandl für die geduldige Einführung in die Rheologie, die freundliche Aufnahme in das Glaskörperprojekt und die gute Zusammenarbeit dabei,
- Axel Ehmer, Florian Sommer, Christian Becker und allen anderen für die unvergesslichen Stunden beim Feierabendbier, beim Lehrstuhlkino, den Schafkopfturnieren und anderen „sozialen Events“ des Lehrstuhls,
- Robert Knerr, Matthias Henke und Matthias Ferstl für die vielen guten Stunden gemeinsam im Labor,
- Lydia Frommer, Liane Öttl, Angelika Berié, Edith Schindler, Andrea Blaimer, Renate Liebl und Stefan Kolb für die organisatorische und vielerlei technische Hilfe,
- allen nicht namentlich erwähnten derzeitigen und ehemaligen Kollegen am Lehrstuhl für das gute Arbeitsklima und die schöne Zeit in Regensburg.

Vielen Dank!!